Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

CHEMISCHE VERÄNDERUNGEN DES 3-ACETYLPYRIDINS DURCH DEN STOFFWECHSEL

(Isolierung und Identifizierung von 6 Metaboliten)

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Friedrich Köhler
aus Frankfurt/Oder

1968

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

CHEMISCHE VERÄNDERUNGEN DES 3-ACETYLPYRIDINS DURCH DEN STOFFWECHSEL

(Isolierung und Identifizierung von 6 Metaboliten)

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Friedrich Köhler
aus Frankfurt/Oder

Dekan: Professor Dr. med. Hans Wolfgang S p i e r

Referent: Professor Dr. med. Hans H e r k e n

Korreferent: Professor Dr. med. Gerhard S e n f t

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 4. 5. 1968

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
Einleitung		1
Methodik		2 - 4
Ergebnisse		5 - 52
I.	Isolierung und Identifizierung von Pyridyl-3-methyl-carbinol-glucuronid	5 - 29
	A. Isolierung von Metabolit I	5
	B. Identifizierung des Metaboliten I als Pyridyl-3-methyl-carbinol-glucuronid	12
II.	Isolierung und Identifizierung von Pyridyl-N-oxyd-3-methyl-carbinol	30 - 40
	A. Isolierung von Metabolit II	30
	B. Identifizierung des Metaboliten II als Pyridyl-N-oxyd-3-methyl-carbinol	33
III.	Isolierung und Identifizierung von Metabolit III als 3-Methyl-carbinol-6-pyridon	41 - 47
	A. Isolierung von Metabolit III	41
	B. Identifizierung des Metaboliten III als 3-Methyl-carbinol-6-pyridon	41
IV.	Isolierung und Identifizierung von Metabolit IV als N-Methyl-3-carboxamid-4-pyridon	48 - 49
	A. Isolierung von Metabolit IV	48
	B. Identifizierung des Metaboliten IV als N-Methyl-3-carboxamid-4-pyridon	48
V.	Isolierung und Identifizierung von Pyridyl-3-methyl-carbinol	50
VI.	Isolierung und Identifizierung von N-Methyl-3-carboxamid-6-pyridon	51 - 52
Diskussion		53 - 58
Zusammenfassung		58
Literaturverzeichnis		59
Lebenslauf		

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552710_0017

E I N L E I T U N G

3-Acetylpyridin (3-AP) ist ein Antimetabolit des Nicotinamid (Übersicht bei Coper und Herken 1963, Herken 1965), der außerordentlich schnell umgesetzt wird. Es entstehen mindestens 12 verschiedene Stoffwechselprodukte (Neuhoff und Harris, 1964). Der Umsatz dieser Verbindungen ist so vollständig, daß kein unverändertes 3-AP mit dem Urin mehr ausgeschieden wird (Beher et al. 1953, Neuhoff und Harris 1964).

Von den Metaboliten des 3-AP sind bisher nur wenige isoliert und identifiziert worden. Beher et al. (1952) haben die Bildung von N-Methyl-nicotinamid und Nicotinsäure nachgewiesen. McKennis et al. (1964) untersuchten, über welche Zwischenstufen 3-AP zu Nicotinsäure werden könnte und haben als mögliche intermediäre Verbindungen Pyridin-3-methyl-carbinol und Pyridin-3-äthan-diol isoliert. Kanig, Koransky u. a. (1964) haben Pyridin-3-methyl-carbinol im ZNS von Tieren gefunden, die mit 3-AP behandelt waren. Neuhoff und Harris (1964) konnten 3-Acetyl-6-pyridon als einen Hauptmetaboliten des 3-AP identifizieren und in verschiedenen Organen nachweisen.

Die Kenntnis der Stoffwechselprodukte ist deshalb von besonderem Interesse, weil dadurch geklärt werden kann, ob an der Ausprägung des vorwiegend zentralnervösen Vergiftungsbildes der 3-AP-Vergiftung Metaboliten beteiligt sind oder nicht. Kanig, Koransky u. a. (1964) diskutieren z. B. die Möglichkeit, daß auch Pyridin-3-methyl-carbinol einen eigenen Effekt bei der 3-AP-Vergiftung haben könnte.

Wir haben daher die von Neuhoff und Harris begonnene systematische Analyse der mit dem Urin ausgeschiedenen Metaboliten fortgesetzt und 6 weitere Stoffwechselprodukte isoliert und identifiziert.

METHODIK

Rattenurin:

400 männliche und weibliche Ratten mit einem Gewicht zwischen 160 und 240 g erhielten 80 mg/kg 3-Acetylpyridin intraperitoneal. Der Urin wurde anschließend über ca. 8 Stunden gesammelt. Nach Konzentration durch Vakuumdestillation wurde er bis zur Aufarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt. Vor der Verarbeitung wurden aliquote Mengen des Urins mit dem Sammelurin von Ratten versetzt, die 100 mg/kg ^{14}C-3-AP erhalten hatten (Spez. Aktivität des ^{14}C-3-AP-Präparates: 8.4 µCurie/mg, Präparat von Dr. H. Schmidt, Farbwerke Hoechst, Frankfurt a. M.).

Ionenaustauscher:

Der nicht weiter vorbehandelte Urin wurde auf insgesamt fünf Kationenaustauscher-Säulen Dowex 50 x 8 (H^+-Form) gegeben. Durchmesser und Höhe der Säulen betrugen 2 cm bzw. 70 - 90 cm. Der Durchlauf und das H_2O-Eluat wurden in 10-ml-Fraktionen gesammelt. Nachdem sich kein UV-positives Material mehr im H_2O-Eluat befand, wurde mit steigender Säurekonzentration durch Zwischenschaltung eines mit Wasser gefüllten 1-Liter-Mischers eine Gradientenelution durchgeführt. Vorgelegt wurden nacheinander 0.2 n, 0.5 n, 1 n, 2 n, 4 n und 6 n HCl. Die Eluate wurden fraktioniert aufgefangen.

Bei der Fraktionierung ein- und desselben Urins in fünf gleichartigen Dowex 50 x 8 Kationenaustauscher-Säulen ist aufgefallen, daß kein Säulenchromatogramm sicher zu reproduzieren war. Die Chromatogramme unterschieden sich teilweise erheblich. Die größten Differenzen traten auf bei Fraktionierungen an frischem und regeneriertem Austauscher.

Dadurch wurde die Isolierung der Metaboliten z. T. sehr erschwert. Für jede Säulenfraktion mußten daher durch Papier- oder Dünnschichtchromatographie erst die jeweils verschiedenen Unterfraktionen gesondert ermittelt werden. Ein Säulenchromatogramm des Urins zeigt Abb. 1.

Als Anionenaustauscher wurde Dowex 1 x 2 in OH^--Form verwendet; Säulendurchmesser 1 cm, Höhe 50 - 70 cm.

Papierchromatographie:

Zur weiteren Trennung einzelner Fraktionen wurden Papier- oder Dünnschichtchromatographie und Ionenaustauscher je nach Bedarf benutzt. Für die Papierchromatographie wurde Whatman Nr. 1 verwendet. Alle Papierbogen wurden vor Gebrauch 1 mal mit Wasser vorgewaschen. Sämtliche Chromatogramme wurden aufsteigend entwickelt. Folgende Fließmittel kamen zur Anwendung:
System A: Butanol, Äthanol, H_2O, NH_4OH (35:15:10:10)
System B: Butanol, Äthanol, H_2O, Eisessig (35:15:10:10)
System C: Butanol, H_2O, Eisessig (100:50:22)

Dünnschichtchromatographie:

Diese wurde ausschließlich mit Kieselgel G (Merck) nach Stahl (1962) durchgeführt. Zugesetzt wurde beim Herstellen der Platten Leuchtpigment ZS Super (Riedel, De Haen). Kieselgel und Wasser wurden im Verhältnis 1 g Kieselgel zu 2 ml H_2O gemischt. Platten aus einfachem Fensterglas, 20 x 20 cm groß, wurden mit einem Beschichtungsgerät (Fa. Chemie-Erzeugnisse und Adsorptionstechnik AG, Muttenz, Schweiz) beschickt. Die Schichtdicke betrug ca. 200 - 300 μ . Nach 12-stündigem Trocknen an der Luft wurden die Platten für etwa 1/2 Stunde bei 60°C im Vakuumtrockenschrank aktiviert. Die Chromatogramme wurden in Wannen aufsteigend entwickelt, wo-

bei sogenannte "gesättigte Kammern" für unsere Zwecke nicht erforderlich waren. Folgende Lösungsmittel-Mischungen wurden als Fließmittel benutzt:

System 1: Benzol, Methanol, Aceton, Eisessig (70:20:5:5)
System 2: Benzol, Methanol, Aceton, Eisessig (60:30:5:5)
System 3: Aceton, Methanol, Äthanol, Ammoniak (60:20:20:3)
System 4: Benzol, Aceton, Äthanol, Ammoniak (40:40:10:3)
System 5: Benzol, Methanol, Aceton (60:30:5)
System 6: Benzol, Aceton, Äthanol, Ammoniak (60:20:15:3)
System 7: Butanol, Methanol, Äthanol, H_2O, Eisessig (20:20:20:20:10)
System 8: Methanol, Benzol, Eisessig (60:20:20)

Die Radioaktivitäten wurden in einem "Tri-Carb Liquid-Scintillation Counting System", Modell 314 EX gemessen. Es wurde in einer Lösung von 2 ml abs. unvergälltem Äthanol und 8 ml Scintillator-Toluol gezählt (Zusammensetzung des Scintillator-Toluol-Gemisches: 0.4 % PPO und 0.005 % POPOP).

E R G E B N I S S E

I. Isolierung und Identifizierung von Pyridyl-3-methylcarbinol-Glucuronid

A. Isolierung von Metabolit I

Bei der Elution der Kationenaustauscher-Säulen mit steigender HCl-Konzentration erschien nach Vorlage von 0.5 n HCl eine erste Fraktion mit viel UV-positivem Material und sehr hoher Radioaktivität. Aus Säule 2 kam sie sehr gut getrennt von der folgenden Fraktion, aus den Säulen 1, 4 und 5 schlechter getrennt und aus Säule 3 zusammen mit zwei weiteren Fraktionen.

Zunächst wurde die entsprechende Fraktion der Säule 1 bearbeitet. Nach Vakuumdestillation enthielt das gelbe Konzentrat große Mengen Kochsalz und Salzsäure. Ein Probechromatogramm in System A ließ erkennen, daß in dieser Fraktion 9 Unterfraktionen enthalten waren. Die Radioaktivität verteilte sich hauptsächlich auf 2, merkwürdig ineinander übergehende Banden. Eine einwandfreie Chromatographie war aber wegen der großen NaCl-Mengen und der hohen HCl-Konzentration nicht möglich. Um das Kochsalz aus der Lösung zu entfernen, wurde die konzentrierte Fraktion an Kieselgel (Korngröße 0,05 - 0,2 mm) adsorbiert. Das Kieselgel nahm dabei eine gelbliche Farbe an und wurde im Exsikkator getrocknet. Es reagierte auch dann noch stark sauer. Anschließend wurde über eine G-4-Fritte mit schwach ammoniakalischem Äthanol eluiert. Dabei wurde das Kieselgel wieder weiß, das Eluat war weiß und radioaktiv. Bei Zugabe von Aceton zum Eluat bildete sich ein weißlicher, amorpher Niederschlag, der auch etwas Radioaktivität zeigte, in der Hauptsache aber NH_4Cl zu sein schien. Proben auf NH_4^+ und Cl^- mit dem Niederschlag fielen positiv aus. Die Radioaktivität fand sich

vorwiegend im Überstand. Der Aceton-Niederschlag wurde über eine G-4-Fritte filtriert. Das Filtrat war klar und von gelblicher Farbe. Der Niederschlag wurde noch mit Aceton gewaschen, die Filtrate vereint und vakuumdestilliert. Der gelbliche Destillationsrückstand enthielt einige Kristalle.

Nach Trocknen im Exsikkator und Aufnehmen in Methanol - H_2O war die Lösung immer noch stark sauer. Auf 87 Papierbogen wurde die gesamte Fraktion in System A chromatographiert. System B brachte keine befriedigende Fraktionierung. Die meiste Radioaktivität gehörte in System A - wie oben erwähnt - zwei Fraktionen an, die unscharf ineinander übergingen. Es entstand der Eindruck einer großen Fraktion mit einer rückwärtigen und einer vorderen Front. Diesen Eindruck verstärkten die getrennt aufgenommenen UV-Spektren der beiden Fronten. Sie waren miteinander nahezu identisch. Als Erklärung für diese zusätzliche Fraktionierung wurde in Erwägung gezogen, daß es sich bei der rückwärtigen Bande um das Hydrochlorid der Substanz, bei der vorderen um die freie Base handeln könnte. Denn die chromatographierte Lösung war salzsauer, das Fließmittel der Chromatographie ammoniakalisch. NH_4OH ist zu schwach basisch, um aus dem Hydrochlorid die Base vollständig freizusetzen.

Von diesem Gedanken ausgehend wurden die zunächst getrennt aus dem Papier eluierten Fraktionen wieder vereint, mit wäßrigem Alkohol verdünnt und mit NaOH auf pH 12 - 13 gebracht. Um die überschüssige Lauge zu entfernen, wurde Aktivkohle eingerührt und über eine G-4-Fritte filtriert. Der alkalische Durchlauf war fast inaktiv. Dann wurde mit einem Gemisch von Aceton und Äthanol reichlich eluiert. Das Eluat war klar gelb und wurde am Vakuumdestillationsgerät eingeengt. An der Kohle blieb nur geringe Radioaktivität adsorbiert. Ein erneutes Papierchromatogramm in System A zeigte nun, daß eine einheitliche, geschlossene Fraktion (Rf = 0.37) vorlag. Daraufhin wurde das gesamte Material

noch einmal über ca. 60 Papierchromatogramme gegeben, nach Streifenelution gesammelt und hinterher durch Vakuumdestillation konzentriert. Das Konzentrat zeichnete sich durch Ansammlung erheblicher Mengen von Papierbestandteilen, gelbliche Farbe und sirupartige Konsistenz aus. Versuche, zu diesem Zeitpunkt den gesuchten Metaboliten aus verschiedenen organischen Lösungsmitteln auszukristallisieren, schlugen fehl.

Inzwischen kam von Säule 2 neues Material der entsprechenden Fraktion zur Bearbeitung. Es wurde gleich mit NaOH auf pH 8 - 9 gebracht, an Kohle adsorbiert und mit Aceton - Äthanol (1 : 1) eluiert und eingeengt. Im Papierchromatogramm stellte sich in System A wiederum eine einheitliche Fraktion mit Rf = 0.37 dar. Die Fraktion wurde nun wie die der Säule 1 in Serien chromatographiert, eluiert und eingeengt. Das Konzentrat bot das gleiche Bild wie das korrespondierende der Säule 1. Eine Kristallisation gelang mit dieser Fraktion ebenfalls nicht.

Das UV-Spektrum des Metaboliten mit einem Maximum bei 260 mμ und zwei Seitenmaxima bei 266 mμ und 254 mμ (Abb. 2) ließ die Vermutung zu, daß die Verbindung am Stickstoff des Pyridinringes nicht substituiert sei, denn in verschiedenen pH-Bereichen traten ganz wesentliche Extinktionsänderungen auf, die bei N-methylierten Pyridinverbindungen in diesem Ausmaß nicht zu beobachten sind. Deshalb wurde eine N-Methylierung mit einem kleinen Teil des gewonnenen Materials versucht. Zu diesem Zweck wurde eine aliquote Menge des sirupösen Konzentrates in H_2O - Äthanol aufgenommen, mit CH_3J versetzt und bei alkalischem pH eine Stunde am Rückfluß gekocht. Nach Abdunsten des überschüssigen CH_3J und papierchromatographischer Reinigung lag eine Verbindung vor, die ebenfalls sehr radioaktiv war und deren UV-Spektrum sich charakteristisch verändert hatte. Vor allem fehlten die Extinktionsänderungen bei verschiedenen pH-Werten. Auch die Maxima an den Seiten bei 266 mμ und 254 mμ waren verstrichen.

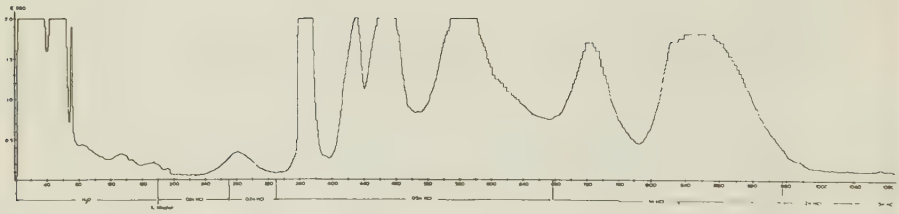


Abb. 1 Ionenaustauschchromatogramm von Rattenurin an Dowex 50 x 8

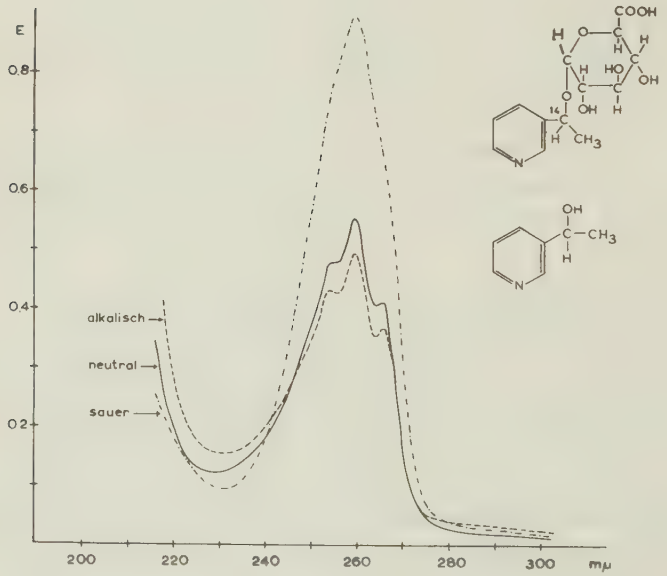


Abb. 2 UV-Spektrum von Pyridyl-3-methyl-carbinol-glucuronid (Diacetonid) und Pyridyl-3-methyl-carbinol

Eine Kristallisation gelang auch mit der N-Methyl-Verbindung nicht, vielleicht weil die eingesetzten Mengen zu klein waren.

Um die Substanz rein darzustellen, wurde nun versucht, mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie zu besseren Resultaten zu kommen. Die durch Papierchromatographie angereicherte Substanz aus Säule 1 und 2 wurde auf ca. 80 Kieselgel-Dünnschichtplatten aufgetragen und in System 2 chromatographiert. Der Metabolit lief dabei mit kleinem Rf-Wert (0.15), gelb-braune Verunreinigungen blieben am Start liegen. Die Fraktion wurde aus den Platten herausgenommen, auf eine gute Zerkleinerung des Kieselgels geachtet und dann mit reichlich ammoniakalischem Methanol eluiert. Das sehr radioaktive Eluat wurde durch Vakuumdestillation konzentriert. Es zeigte sich dabei, daß eine größere Menge Kieselgel mit dem Elutionsmittel das Filter passiert hatte. Durch 30 min. Zentrifugieren bei 16000 UpM wurde der größte Teil des Kieselgels aus dem Konzentrat entfernt. Dem sirupösen, gelblichen Überstand wurde Aceton, Äther und Methanol zugefügt und die Lösung über Nacht in der Kälte belassen. Es setzte sich ein hoch radioaktiver Niederschlag von gelblich-weißer Farbe ab, der aber noch sehr viel Ammoniumacetat enthielt. Die Acetat-Ionen stammten aus der Dünnschichtchromatographie, die Ammonium-Ionen aus dem Elutionsmittel. Durch diesen Schritt war klar geworden, daß mit Aceton-Äther-Methanol der Metabolit I wahrscheinlich gefällt oder auskristallisiert werden konnte.

Um die Substanz von Acetat-Ionen zu befreien, wurde sie, in Wasser gelöst, auf eine Anionenaustauscher-Säule (OH^--Form) gegeben. Die radioaktive Verbindung ließ sich nicht mit Wasser eluieren, sondern blieb am Anionenaustauscher hängen. Damit war die wichtige Feststellung getroffen, daß die Substanz eine oder mehrere Gruppen mit Säurefunktion haben mußte. Der Metabolit ließ sich erst mit 0.06 n HCl eluieren. Das Eluat wurde eingeengt und im Ex-

sikkator getrocknet. Es bildete sich eine gelbliche, wiederum sirupöse Masse, in der keinerlei Kristallstrukturen zu erkennen waren. Der Versuch, von dieser Probe ein auswertbares Infrarotspektrum zu erhalten, scheiterte an den immer noch zu großen Verunreinigungen, die diesmal hauptsächlich aus dem Kunstharzaustauscher stammen mußten.

Aus der in der Zwischenzeit eluierten Säule 3 wurde der Metabolit I nicht in einer Fraktion sondern zusammen mit zwei weiteren Fraktionen in einer außerordentlich grossen Ansammlung UV-positiven Materials erhalten. Da jetzt aber schon bekannt war, daß der Metabolit I am Anionenaustauscher haften blieb, wurde er auf diese Weise von dem anderen, in der gleichen Fraktion enthaltenen Material getrennt. Der ebenfalls radioaktive Durchlauf und das H_2O-Eluat wurden eingeengt und für eine spätere Aufarbeitung zurückgestellt. Die Elution des Metaboliten I erfolgte wiederum mit 0.06 n HCl. Die Lösung wurde konzentriert und enthielt ebenfalls reichlich Verunreinigungen aus dem Austauscher.

Deshalb wurde noch einmal versucht mittels Dünnschichtchromatographie zur Reindarstellung des Metaboliten zu kommen. Die konzentrierten Eluate aus dieser und der oben erwähnten Anionenaustauscher-Säule wurden auf etwa 70 Kieselgel-Dünnschichtplatten aufgetragen und in System 3 chromatographiert. Es wurde diesmal absichtlich ein ammoniakalisches Lösungsmittel gewählt, um von vornherein die spätere Bildung von Ammoniumacetat zu verhindern. Der Metabolit läuft in System 3 mit einem Rf-Wert von 0.11. Die Fraktion wurde aus den Platten herausgekratzt und nach guter Zerkleinerung des Kieselgels mit ammoniakalischem absolutem Äthanol eluiert. Durch NH_4OH sollte die Löslichkeit von Kieselgel in Äthanol weiter zurückgedrängt werden. Das Eluat wurde durch Vakuumdestillation stark eingeengt und bis zur eben beginnenden Trübung mit Aceton versetzt. Nach 12-stündigem Stehen in der Kälte hatte sich eine rein weiße, kristalline

Substanz abgesetzt, an deren Identität mit dem gesuchten Metaboliten I kaum noch Zweifel bestanden. Der kristalline Niederschlag wurde in einem Spitzglas bei 3000 UpM abzentrifugiert, noch einmal in wenig warmem Alkohol aufgenommen, mit einem Tropfen NH_4OH versetzt und wiederum mit Aceton auskristallisiert. Die Zugabe von Ammoniak erhöhte die Löslichkeit der Verbindung in Äthanol. Der abzentrifugierte Niederschlag wurde mit Aceton nachgewaschen. Die kristallisierte Substanz hatte eine Radioaktivität von 5.13×10^4 IpM/mg. Die Kristalle drehten die Ebene des polarisierten Lichtes im Mikroskop nicht. Der Schmelzpunkt wurde zu 191 - 192°C festgestellt. Das von der kristallinen Substanz aufgenommene UV-Spektrum zeichnete sich durch besondere Schärfe der Maxima und Minima aus (Abb. 2). Das Infrarot-Spektrum zeigt Abb. 3. Nach der Aufarbeitung des gesamten Elu-

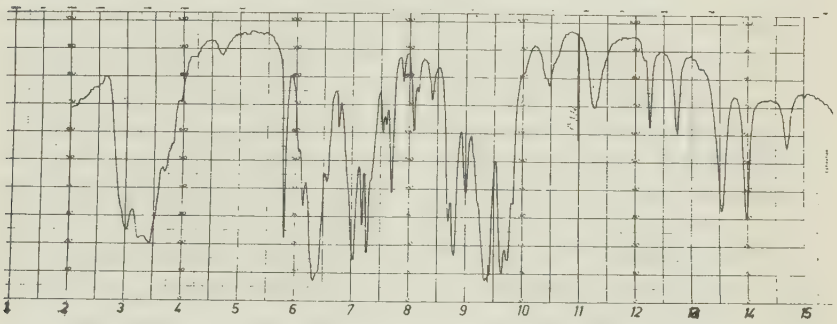


Abb. 3 IR-Spektrum von Pyridyl-3-methyl-carbinol-glucuronid (Diacetonid)
(aufgenommen in KBr)

ates in der beschriebenen Weise standen ca. 300 mg der kristallinen Substanz für die Aufklärung der Struktur zur Verfügung

B. Identifizierung des Metaboliten I als Pyridyl-3-methyl-carbinol-glucuronid

Schon früher war eine erhebliche Ähnlichkeit zwischen dem UV-Spektrum des Metaboliten I und dem des Pyridyl-3-methyl-carbinols aufgefallen, die nun so vollständig war, daß man von einer Identität sprechen konnte. Die Substanzen konnten jedoch nicht identisch sein, denn der Metabolit hatte in sämtlichen daraufhin geprüften papier- und dünnschichtchromatographischen Systemen einen wesentlich geringeren Rf-Wert als Pyridyl-3-methyl-carbinol. (Als Vergleich wurde synthetisch hergestelltes Pyridyl-3-methyl-carbinol verwendet, Präparat von Prof. Dr. Koransky, Pharm. Institut der FU Berlin.) Dazu kam die Beobachtung, daß der Metabolit am Anionenaustauscher hängen blieb, während sich Pyridyl-3-methyl-carbinol bei Passage über einen solchen Austauscher im Durchlauf befindet. Es mußte also, wie oben erwähnt, bei dem unbekannten Stoff noch zusätzlich mindestens eine Gruppe mit Säurefunktion vorhanden sein. Der immer wieder beobachtete kleine Rf-Wert in verschiedenen Systemen sprach für das Vorliegen eines größeren Moleküls.

Die Beobachtung von Beher (1953), daß nach Applikation von 3-Acetylpyridin die Ausscheidung von Glucuroniden mit dem Urin erhöht wird und die Vermutung von McKennis (1964), daß Pyridyl-3-methyl-carbinol als Glucuronid ausgeschieden werden könnte, legten den Gedanken an einen Glucuronsäure-Paarling nahe. Daraufhin angestellte Proben auf Glucuronsäure bzw. Glucuronide nach Dishe (1947) und Fishman (1955) fielen positiv aus. Bei der Farbreaktion nach Fishman wird eine Glucuronsäure enthaltende Lösung blau, bei der Reaktion nach Dishe rot. Bei der Dishe-Reaktion erreicht die rote Farbe nach 2 Stunden ihr Intensitätsmaximum und hat ein Absorptionsmaximum bei 523 mμ. Diese Be-

dingungen erfüllte der Metabolit I exakt.

Der positive Ausfall beider Reaktionen sprach sehr für das Vorliegen eines Glucuronids. Der daraufhin vorgenommene Versuch, den Metaboliten mit Glucuronidase (Präparat der Fa. Th. Schuchardt, München) zu hydrolysieren, ist jedoch gescheitert, obwohl die dafür von Bergmeyer (1962) angegebenen Versuchsbedingungen genau eingehalten wurden. Wenn dieser Mißerfolg zunächst auch nicht erklärt werden konnte, wurde die Arbeitshypothese "Glucuronid" dennoch aufrecht erhalten.

Die Identität des UV-Spektrums mit dem von Pyridyl-3-methyl-carbinol legte zwar den Verdacht sehr nahe, daß es sich um das Glucuronid dieser Verbindung handeln könnte, schloß aber nicht aus, daß auch das Glucuronid des Pyridyl-3-äthan-diol vorliegen könnte, zumal McKennis (1964) das Vorkommen dieser Verbindung im Urin von Hunden beschreibt, die 3-Acetylpyridin erhalten hatten. Die zweite alkoholische OH-Gruppe würde kaum einen wesentlichen Einfluß auf das chromophore System und damit auf das UV-Spektrum dieser Pyridinverbindung haben. Um das auszuschliessen, wurde ein aliquoter Teil des Metaboliten I in seiner kristallinen Form mit Perjodsäure versetzt und erhitzt. Beim Vorliegen eines Glucuronids des Pyridyl-3-äthan-diols hätte dabei Pyridyl-3-aldehyd entstehen müssen. Das war nicht der Fall. Wie die Dünnschichtchromatographie ergab, blieb Metabolit I völlig unverändert. Das wurde als weiterer Hinweis für Pyridyl-3-methyl-carbinol-Glucuronid gewertet.

Um zunächst den einen Teil des vermuteten Paarlings - das Pyridyl-3-methyl-carbinol - weiter zu bestätigen, wurde mit der kristallinen Substanz der Methylierungsversuch wiederholt. Ein aliquoter Teil des Metaboliten I wurde in absolutem Äthanol aufgenommen, mit Methyljodid und NaOH versetzt und 2 - 3 Stunden am Rückfluß gekocht. An-

schließend wurde der Alkohol und das überschüssige Methyljodid abdestilliert. Der Rückstand wurde aus wenig Alkohol mit Äther auskristallisiert. Das von den Kristallen aufgenommene UV-Spektrum zeigte neben einem Maximum bei 264 mμ, das sich in verschiedenen pH-Bereichen weder verschob noch Extinktionsänderungen aufwies, ein zweites Maximum bei 225 mμ. Dadurch unterschied es sich ganz wesentlich von dem Spektrum synthetisch hergestellten N-methyl-pyridyl-3-methyl-carbinols (Abb. 4). Um die Möglichkeit eines Artefak-

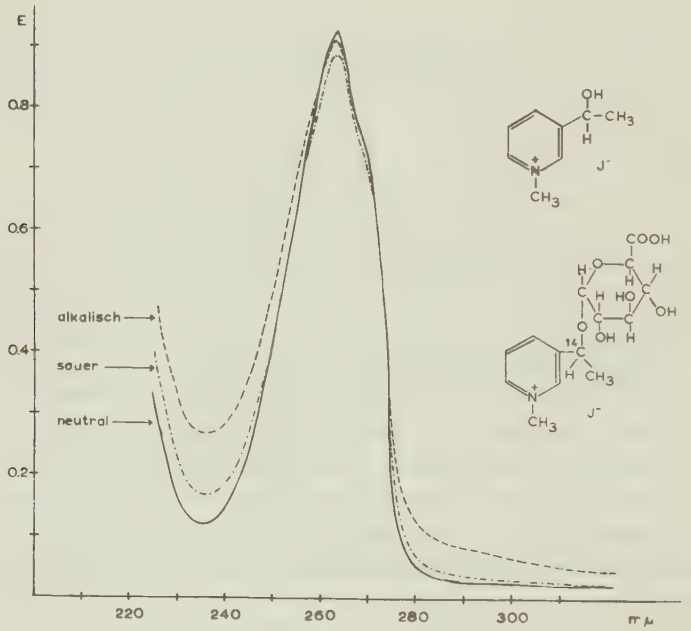


Abb. 4 UV-Spektrum von N-methyl-pyridyl-3-methyl-carbinol-glucuronid und N-methyl-pyridyl-3-methyl-carbinol

tes auszuschließen, wurde eine Probe des Materials durch Dünnschichtchromatographie in System 8 gereinigt und nach

Auskratzen der Fraktion und Elution mit H_2O wiederum ein Spektrum aufgenommen. Das zweite Maximum bei 225 mμ war jetzt verschwunden und das UV-Spektrum völlig gleich mit dem von synthetischem N-methyl-pyridyl-3-methyl-carbinol. Die Vermutung, daß das zweite Maximum bei 225 mμ als Artefakt von NaJ oder $NaJO_3$ stammen könnte, wurde durch Aufnehmen des UV-Spektrums von NaJ bestätigt. Diese Verbindung hat ein Maximum bei 225 mμ (Abb. 5). Eine Identität des N-methylierten Metaboliten I mit N-methyl-pyridyl-3-methyl-carbinol war aber wiederum durch Vergleich der Rf-Werte bei Papierchromatographie in System C auszuschließen (N-

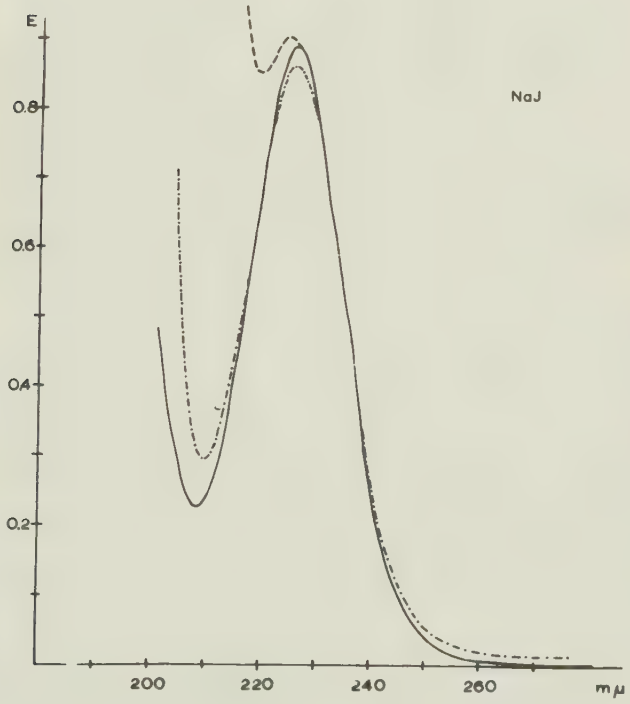


Abb. 5 UV-Spektrum von NaJ

methylierter Metabolit = 0.19, N-methyl-pyridyl-3-methyl-carbinol = 0.47). Die Identität der UV-Spektren beider N-methylierter Verbindungen war aber im Zusammenhang mit der völligen Übereinstimmung der Spektren von Pyridyl-3-methyl-carbinol und dem nicht methylierten Metabolit I als weiterer Hinweis für das Vorliegen eines substituierten Carbinols zu werten.

Die nunmehr versuchte säurehydrolytische Spaltung des Metaboliten brachte eine weitere Bestätigung für die Annahme, es handele sich um einen Glucuronsäure-Paarling. Zunächst wurde der Metabolit mit 0.1 n HCl eine Stunde im Wasserbad auf 100°C gebracht. Anschließende Dünnschichtchromatographie neben einer Probe von Pyridyl-3-methyl-carbinol als Vergleichssubstanz zeigte, daß sich der Rf-Wert des Metaboliten nicht verändert hatte. Erst nach Behandlung mit 1 n HCl unter sonst gleichen Bedingungen deutete sich eine teilweise erfolgte hydrolytische Spaltung dadurch an, daß im Dünnschichtchromatogramm auf der Höhe der Vergleichssubstanz eine schwache Bande zu sehen war. Die Hauptmenge des Metaboliten war aber noch an der Stelle zu sehen, die seinem eigentlichen Rf-Wert entsprach. Daraufhin wurde der Versuch wiederholt und 30 min. mit 1 n HCl bei 140°C im zugeschmolzenen Glasrohr hydrolysiert. Die Lösung färbte sich diesmal während der Inkubation gelb. Jetzt war die Hydrolyse vollständig, denn im Dünnschichtchromatogramm lief mit gleichem Rf-Wert wie Pyridyl-3-methyl-carbinol eine gut sichtbare Fraktion, während die Stelle, die dem Rf-Wert des gesuchten Metaboliten entsprach, von UV-positivem Material frei blieb. Das UV-Spektrum des auf gleicher Höhe mit Pyridyl-3-methyl-carbinol laufenden Materials war mit dem des Carbinols identisch.

Um den Pyridyl-3-methyl-carbinol-Anteil und die Glucuronsäure des Paarlings noch einmal getrennt nachzuweisen und ausreichend Material für ein beweisendes Infrarot-Spektrum zu erhalten, wurde folgender Versuch durchgeführt:

Eine größere Menge des kristallinen Metaboliten wurde bei 140°C in 1 n HCl hydrolysiert. Als Kontrolle wurde eine Probe von reinem Glucuronsäurelacton (Merck) ebenso behandelt. Kontrollprobe und Metabolit wurden danach auf je eine Säule eines Anionenaustauschers (Dowex 1 x 2, OH^-) gegeben. Durchlauf und H_2O-Eluat der Säulen wurden eingeengt und auf UV-positives Material geprüft. Erwartungsgemäß fand es sich nur im H_2O-Eluat der Säule, auf die der hydrolysierte Metabolit I aufgetragen wurde. Das UV-Spektrum entsprach dem von Pyridyl-3-methyl-carbinol. Zur Reinigung wurde das Material in System 4 dünnschichtchromatographiert. Nach Passage über die Kieselgel-Platten wurde die unter der UV-Lampe allein sichtbare Fraktion herausgekratzt und mit ammoniakalischem Äthanol eluiert. Das durch Vakuumdestillation konzentrierte Eluat wurde bei 16000 UpM eine halbe Stunde vom Kieselgel abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig mit einer Mikropipette abgenommen und im Exsikkator getrocknet. Vom sirupösen Rückstand wurde dann ein Infrarot-Spektrum in CCl_4 aufgenommen, das mit dem von authentischem Pyridyl-3-methyl-carbinol identisch war (Abb. 6 u. 7).

Am Anionenaustauscher mußte jetzt noch der Molekülteil mit Säurefunktion - die vermutete Glucuronsäure - haften. Die beiden Säulen wurden - wie früher der Metabolit I - mit 0.06 n HCl eluiert. Es setzten sich daraufhin in beiden Säulen scharf begrenzte, deutlich sichtbare gelbliche Zonen in Bewegung, die jeweils getrennt aufgefangen wurden. Sie enthielten Material, das in kleinsten Mengen positive Dishe- und Fishman-Reaktionen auf Glucuronsäure gab. Nach Einengen durch Vakuumdestillation wurden Proben beider Säulen auf einer mit 0.1 %-iger Borsäure imprägnierten Kieselgel-Dünnschichtplatte (Stahl, 1962, S. 475) in System 7 chromatographiert. Nach Besprühen mit 0.2 %-iger alkoholischer Lösung von 1,3-Dioxynaphthalin, die mit konzentrierter H_2SO_4 versetzt wurde, sah man nach dem Trocknen bei 100°C zwei blaue Fraktionen mit gleichem Rf-Wert (0.48) (Abb. 8). Die Intensität der Farben nahm bei längerem Lie-

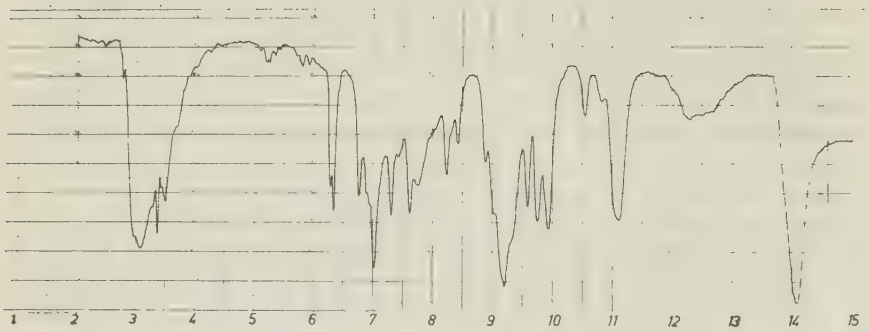


Abb. 6 IR-Spektrum von synthetischem Pyridyl-3-methyl-carbinol (Lösungsmittel: Tetrachlorkohlenstoff)

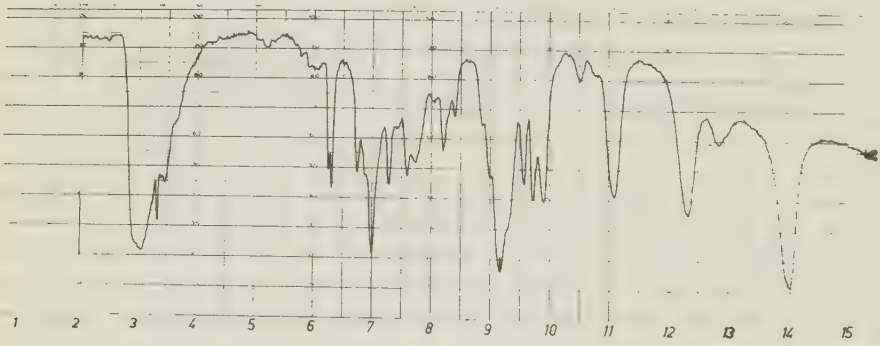


Abb. 7 IR-Spektrum von ^{14}C-Pyridyl-3-methyl-carbinol, gewonnen durch Hydrolyse von Pyridyl-3-methyl-carbinol-glucuronid (aufgenommen in Tetrachlorkohlenstoff)

gen bei Zimmertemperatur noch zu. Der unbehandelte Metabolit I, der zum Vergleich aufgetragen war, gab ebenfalls eine positive Blaureaktion und war im Gegensatz zur Glucuronsäure auch im UV-Licht sichtbar (Abb. 8).

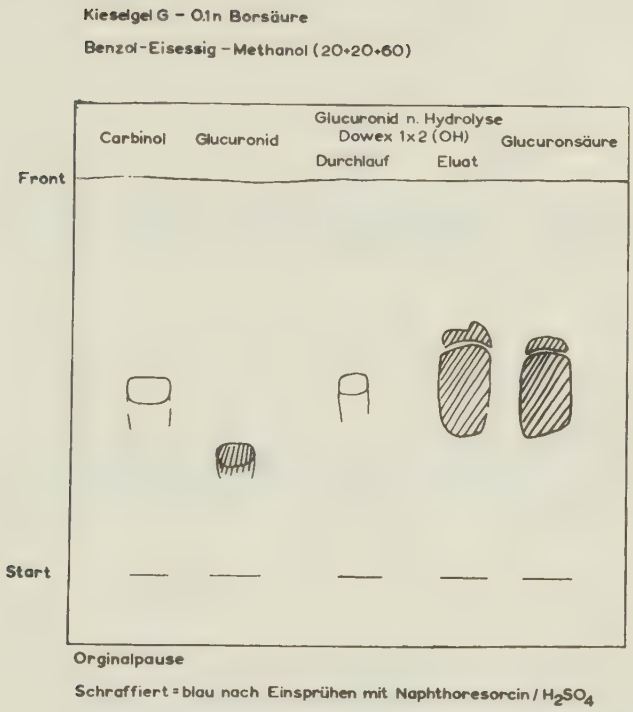
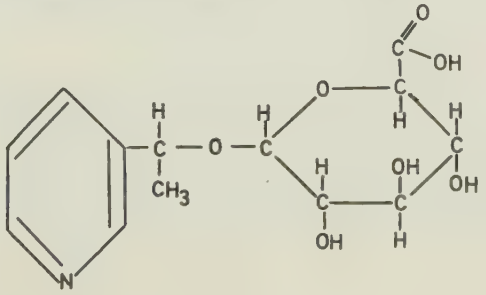


Abb. 8 Erläuterungen siehe Text

Nach diesen Befunden kam als Struktur des isolierten Metaboliten I nur das Glucuronid des Pyridyl-3-methyl-carbinols mit einem Molekulargewicht von 298,26 in Frage (Formel 1).

Formel 1



Eine daraufhin vorgenommene Mikrotitration bestätigte zwar das Vorliegen einer sauren Funktion, das danach berechnete Äquivalent-Gewicht lag aber über 400. Die Elementaranalyse(+) der kristallinen Reinsubstanz ergab:

C	H	N	
54,70	8,56	6,20	
54,26	8,49	6,38	
54,48	8,52	6,29	(Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung)

und aus der Differenz zu 100 % für

O
30,71.

Um Substanz einzusparen, wurde auf die Sauerstoffanalyse verzichtet.

Für Pyridyl-3-methyl-carbinol-glucuronid errechnen sich diese Werte zu:

C	H	N	O
52,40	5,40	4,69	37,51

Es bestand also auch hier keine Übereinstimmung.

Die Massen- und Kernresonanzspektren erbrachten neue Hinweise. Auffällig war, daß im Massenspektrum (Abb. 9) nicht wie üblich eine Haupt-Masse zu erkennen war, aus der das Molekular-Gewicht hätte ermittelt werden können, sondern das Molekül offenbar in zahlreiche Bruchstücke zerfiel, die vielen verhältnismäßig kleinen Massen entsprachen. Der intensivste Massenpeak wurde durch eine Masse von 58 hervorgerufen. Außerdem fielen im Massenspektrum immer wie-

---

(+) Herrn Dr. Winterfeld, Organ.-chem. Institut der Technischen Universität Berlin, danke ich für die gaschromatographische Elementaranalyse.

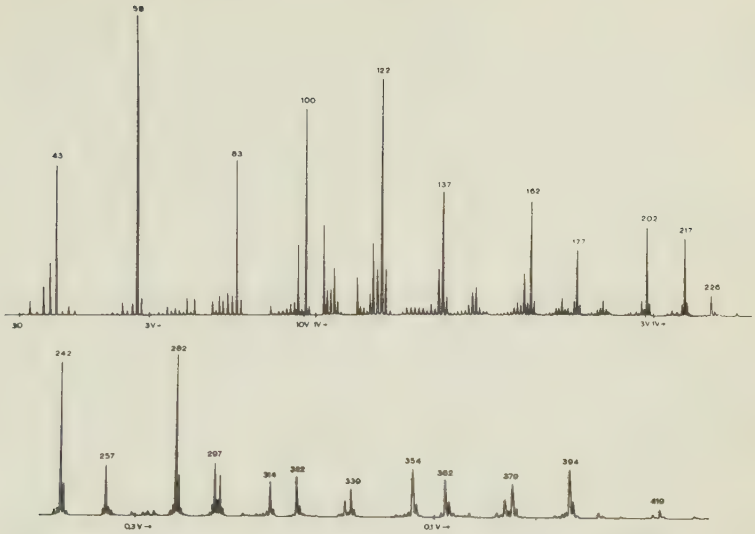


Abb. 9 Massenspektrum von Metabolit I (Originalpause)

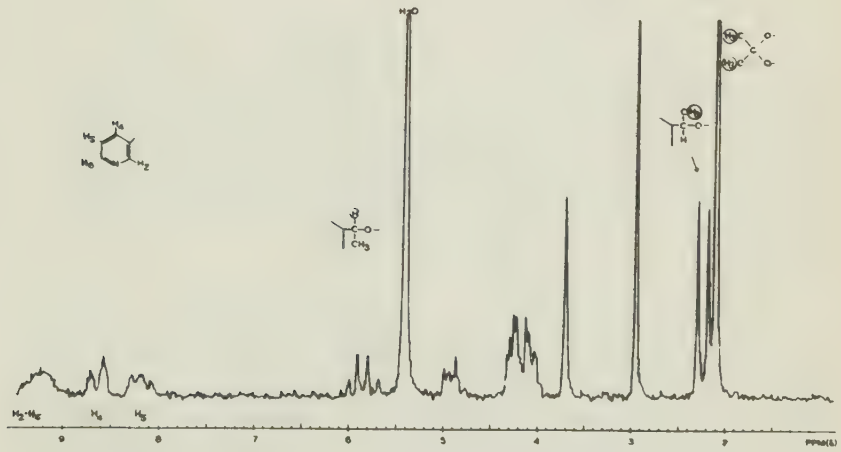


Abb. 10 Kernresonanzspektrum von Metabolit I. Aufgenommen in D_2O mit einem Varian A 60 (Originalpause)

der Sprünge von 15 bzw. 40 Masseneinheiten zwischen grösseren Peaks auf. Eine Masse von 122 entsprach sehr wahrscheinlich dem Pyridyl-3-methyl-carbinol (MG = 123.15), eine von 297 dem vermuteten Glucuronid (MG = 298.26). Darüberhinaus erschienen auch Massen bis über 400.

Das Kernresonanzspektrum der Substanz, in D_2O mit einem Varian A 60 aufgenommen, zeigt Abb. 10. Zunächst bestätigte es das Vorliegen von Pyridyl-3-methyl-carbinol. Die Signale bei δ 2.2 und δ 2.3 entsprechen nach der elektrischen Integration den drei Protonen der CH_3-Gruppe des Pyridyl-3-methyl-carbinols. Das hohe Signal bei δ 5.4 ist durch H_2O ausgelöst, das als Verunreinigung in D_2O noch enthalten ist. Die Signale bei δ 5.8, 8.2, 8.6 und 9.3 waren dem restlichen Proton der Carbinolseitenkette bzw. den Protonen des Pyridinringes zuzuordnen. Das hohe Signal bei δ 2.1 entspricht nach der elektrischen Integration 6 Protonen. Die Signale bei δ 2.9, 3.7, 4.2 und 4.9 entsprachen 3, 2, 4 und 1 Protonen und waren keiner definierten Gruppe zuzuordnen.

Der im Massenspektrum sehr intensive Massenpeak bei 58 und das im Kernresonanzspektrum auftretende Signal bei δ 2.1 (= 6 Protonen) machten es wahrscheinlich, daß die Verbindung als Acetonid vorliegen könnte. Aceton hat ein Molekulargewicht von 58.08 und 6 H-Atome. Zucker reagieren sehr leicht mit Aceton unter Bildung von Isopropyliden-Derivaten zu sog. Acetonzuckern. Als Acetale sind sie beständig gegen Alkalien. Die Isopropyliden-Gruppen lassen sich durch Säurehydrolyse leicht abspalten (Noller, 1960, S. 399 - 400).

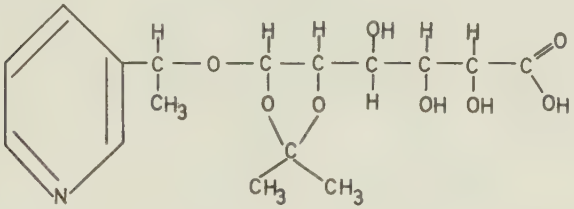
Bei der Isolierung und Kristallisation des Metaboliten war immer wieder mit Aceton und Ammoniak gearbeitet worden, und damit reichlich Möglichkeiten zur Bildung eines Acetonids der Glucuronsäure gegeben. Die Sprünge von 15 Masseneinheiten, die zwischen einigen Peaks im Massenspektrum auftraten, ließen sich dann als Verluste von C H_3-Gruppen

(= 15 Masseneinheiten) im Molekül gut erklären.

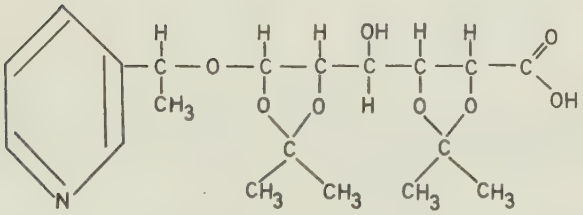
Die Bildung von Isopropyliden-Verbindungen ist nur bei Zuckern mit nachbarständigen Hydroxyl-Gruppen möglich. Bei dem vorliegenden Glucuronid hätte also sowohl ein Mono- als auch ein Diacetonid entstehen können. Das Monoacetonid (Formel 2) hätte ein Molekulargewicht von 333.34 und folgende Verteilung für:

	C	H	N	O
	50,44	6,95	4,20	38,41
gefunden:	54,48	8,52	6,29	(30,71)

Der Vergleich mit den Werten der Elementaranalyse sprach gegen ein Monoacetonid.



Formel 2

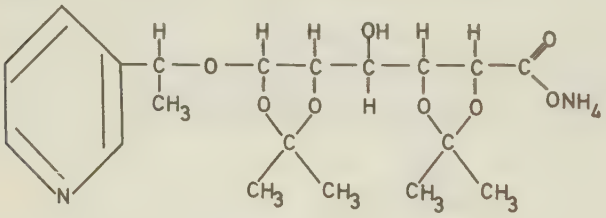


Formel 3

Ein Diisopropyliden-Glucuronid (Formel 3) hätte bei einem Molekulargewicht von 397.43 eine Verteilung von:

	C	H	N	O
	57,42	6,85	3,53	32,20
gefunden:	54,48	8,52	6,29	(30,71)

Die gefundenen Analysenwerte stimmten auch jetzt noch nicht gut damit überein. Die Differenz beim Stickstoff sprach dafür, daß die isolierte Verbindung noch ein weiteres Stickstoff-Atom im Molekül enthalten mußte. Da bei der Isolierung und ebenso bei der Kristallisation fast immer im ammoniakalischen Milieu gearbeitet wurde, war nicht ausgeschlossen, daß das Glucuronid alsAmmoniumsalz vorlag. Eine daraufhin mit den Kristallen vorgenommene Nachweisreaktion auf NH_4^+ durch Austreiben mit konzentrierter Natronlauge in der Wärme verlief eindeutig positiv.



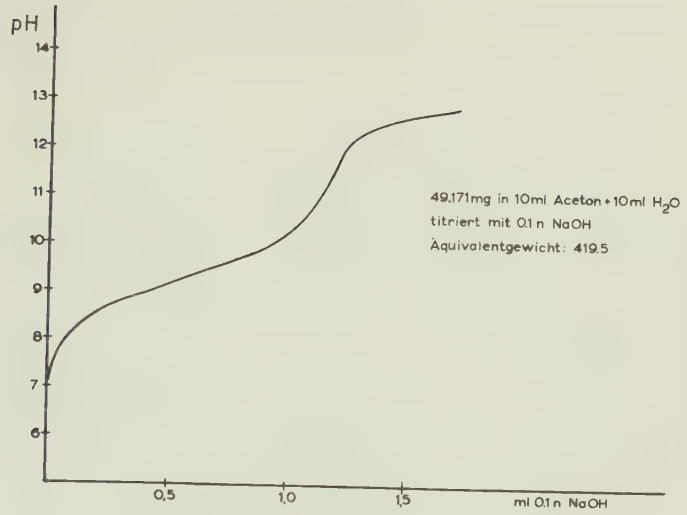
Formel 4

Das Ammoniumsalz der Pyridyl-3-methyl-carbinol-1,2: 4,5-diisopropyliden-glucuronsäure (Formel 4) hat ein Molekulargewicht von 414,45 und folgende Verteilung für:

	C	H	N	O
	55,06	7,30	6,76	30,88
gefunden:	54,48	8,52	6,29	(30,71)

Der Vergleich mit den Werten der Elementaranalyse ergibt die bisher beste Übereinstimmung beider Werte.

Um weiter zu bestätigen, daß die isolierte Verbind-



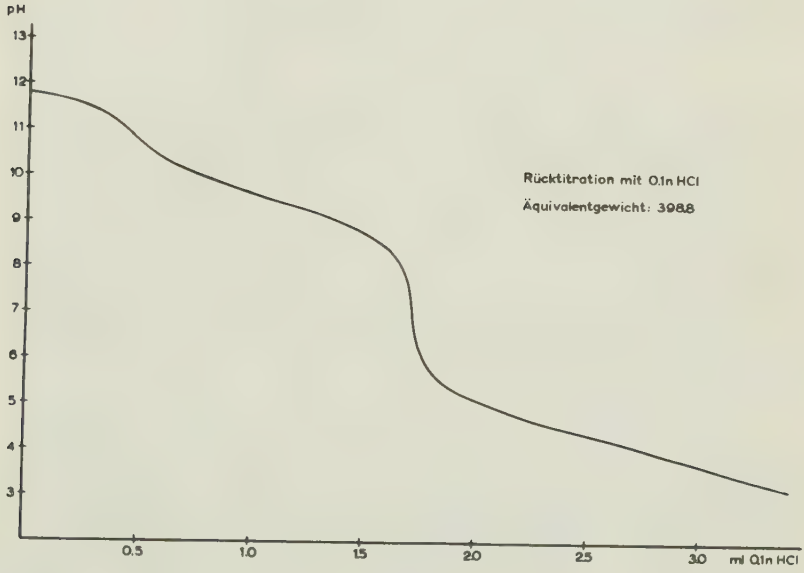


Abb. 11 u. 12 Titrationskurven von Pyridyl-3-methyl-carbinol-1,2:4,5-diisopropyliden-glucuronsäure (NH_4-Salz)

ung das Diacetonid und Ammoniumsalz des Pyridyl-3-methylcarbinol-glucuronids ist, wurde mit einer größeren Substanzmenge das Äquivalentgewicht noch einmal titrimetrisch bestimmt. Die Titrationskurven sind in Abb. 11 u. 12 dargestellt. 49.171 mg der kristallinen Reinsubstanz wurden in H_2O/Aceton gelöst und zunächst mit 0.1 n NaOH titriert. Da bei einbasischen Säuren das Äquivalentgewicht gleich dem Molekulargewicht ist, wurde nach der 1. Titration ein Molekulargewicht von 419.5 berechnet. Die alkalische Lösung wurde sodann auf ca. 60°C erwärmt und 1 Stunde mit Stickstoff durchperlt, um NH_4^+ auszutreiben. Anschließend wurde mit 0.1 n HCl zurücktitriert (Abb. 12). Der erste flache pH-Sprung dieser Titrationskurve entspricht dem überschüssigen NaOH, der zweite der -COOH Gruppe. Aus der zweiten Titrationskurve ließ sich das Molekulargewicht jetzt zu 398.8 berechnen. Die Differenz zwischen den beiden titrimetrisch ermittelten Molekulargewichten entspricht dem freigesetzten NH_4^+, und die gefundenen Molekulargewichte stimmen sehr gut mit den theoretischen überein.

Ein weiterer Versuch bestätigte, daß die angenommene Struktur mit größter Wahrscheinlichkeit zutreffend ist:

Es wurde eine gravimetrische Bestimmung des Acetons und der Glucuronsäure mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (Houben-Weyl, Meth. d. org. Chemie, Bd. II, 1953, S. 457) durchgeführt. Unter den zahlreichen Bestimmungsmethoden für Aldehyde und Ketone war diese die geeignetste, weil sie in stark saurem Milieu abläuft, das zur Hydrolyse des Acetonzuckers und des Glucuronids erforderlich ist. Folgendermaßen wurde vorgegangen:

33.52 mg des Metaboliten I wurden in Äthanol aufgenommen und unter Rühren zu einer 2.5-promilligen, schwefelsauren 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung gegeben. Um mit Sicherheit eine Hydrolyse des Acetonids bzw. des Glucuronids zu bewirken, wurde der Reaktionsansatz auf ca. 80 - 90°C erwärmt. Nach längerem Umrühren stand die Lösung eine Nacht im Kühlschrank. Das auskristallisierte Hydrazon wurde abzentrifugiert, mit H_2O gewaschen, bei 110°C im Trok-

kenschrank getrocknet und gewogen. Die Auswaage betrug 65 mg.

Der theoretisch zu erwartende Wert wurde wie folgt berechnet:

Die Einwaage von 33.52 mg lag als NH_4-Salz vor. Zur Reaktion kam die freie Säure, also 32.12 mg, die der Berechnung zugrunde zu legen waren. Auf ein Mol des Metaboliten entfallen unter Annahme des Diacetonids zwei Mol Aceton und ein Mol Glucuronsäure, auf die Einwaage umgerechnet also 9.40 mg Aceton und 15.72 mg Glucuronsäure. Daraus lassen sich nach Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin für das Hydrazon vom Aceton 38.52 mg und für das Glucuronsäurehydrazon 30.28 mg errechnen. Theoretisch müßten also insgesamt 68.80 mg Hydrazon gefunden werden. Gefunden wurden 65 mg, also 94 % des theoretischen Wertes.

Danach bestanden keine Zweifel mehr daran, daß der Metabolit I als Ammoniumsalz der Pyridyl-3-methyl-carbinol-1,2:4,5-diisopropyliden-glucuronsäure isoliert wurde.

Um noch eine weitere Bestätigung zu erhalten, wurde nun noch der Methylester des Metaboliten I hergestellt, in der Hoffnung, daß diese Verbindung leichter flüchtig sei und so ein besser auswertbares Massenspektrum zu erhalten war. Diazomethan wurde aus Nitrosomethylharnstoff nach Gattermann (1961, S. 234) hergestellt. Ein aliquoter Teil der radioaktiven Reinsubstanz wurde in Äther/Alkohol gelöst und solange mit der ätherischen Diazomethan-Lösung versetzt, bis keine Gasentwicklung mehr erkennbar war. Nach Abdunsten von überschüssigem Reagenz wurde der Rückstand im Exsikkator getrocknet. Da nur sehr kleine Mengen zur Verfügung standen, wurde auf weitere Reinigung verzichtet und der sirupöse, stark alkalisch reagierende Rückstand direkt für die Massenspektroskopie verwendet. Das Original-Massenspektrum ist in Abb. 13 wiedergegeben. Auch der Methylester ist in zahlreiche kleinere Massen zerfallen. Die Masse von 58 entspricht wiederum Aceton, die von 123/124 dem Pyridyl-

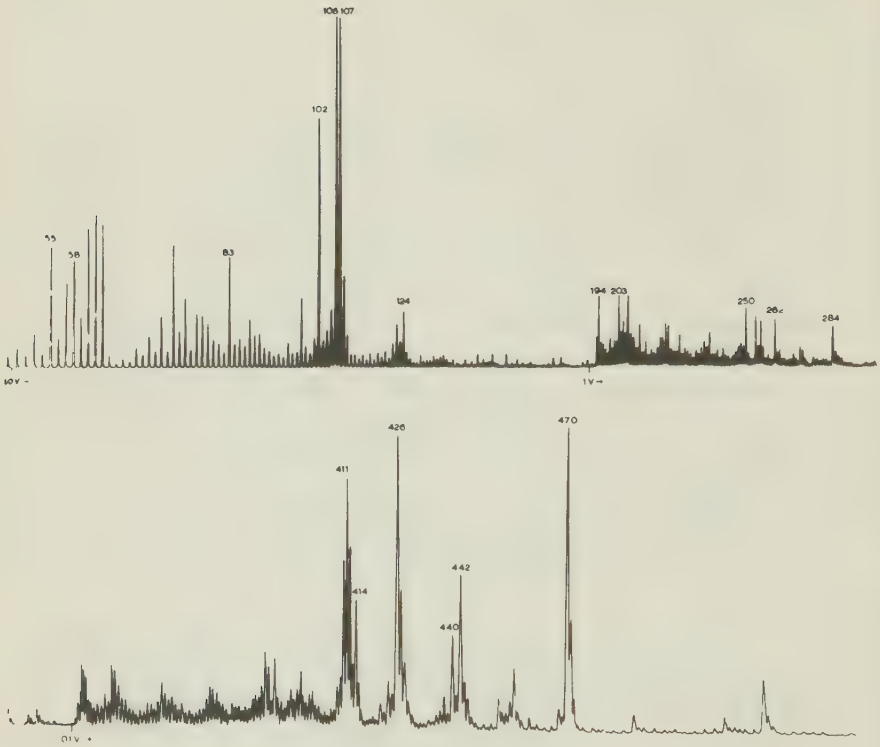


Abb. 13 Massenspektrum des 1,2:4,5-Diisopropyliden-3-methoxy-glucuronsäure-methylester des Pyridyl-3-methyl-carbinols (Originalpause)

3-methyl-carbinol, die von 194 der Glucuronsäure. Ein deutlicher Massenpeak bei 411 entspricht dem Methylester des Diacetonids. Erwartungsgemäß findet sich auch noch eine Masse von 426. Am C_3-Atom der Diisopropyliden-glucuronsäure ist eine freie Hydroxylgruppe, die bei der Reaktion mit Diazomethan ebenfalls methyliert wurde. Der 1,2:4,5-Diisopropyliden-3-methoxy-glucuronsäure-methylester des Pyridyl-3-methyl-carbinols hat ein Molekulargewicht von 425.46. Die

darüber hinaus noch auftretenden höheren Massenpeaks sind nicht zuzuordnen und entsprechen sehr wahrscheinlich Verunreinigungen des Präparates.

Der Metabolit I ist also das Glucuronid des Pyridyl-3-methyl-carbinols. Die Identifizierung wurde dadurch erheblich erschwert, daß während der Isolierung aus dem Pyridyl-3-methyl-carbinol-glucuronid das Ammoniumsalz der Pyridyl-3-methyl-carbinol-1,2:4,5-diisopropyliden-glucuronsäure entstanden ist. Auf dieses Stoffwechselprodukt entfallen 35 - 40 % der nach Applikation von ^{14}C-3-AP mit dem Urin ausgeschiedenen Radioaktivität.

Jetzt ist auch verständlich, warum der anfangs durchgeführte Versuch, den isolierten Metaboliten enzymatisch mit einer Glucuronidase zu hydrolysieren, fehlgeschlagen ist. Da kein reines Glucuronid, sondern ein Diacetonid in die Reaktion eingesetzt wurde, konnte auch keine enzymatische Hydrolyse stattfinden. Mit diesem Befund stimmt auch das Ergebnis eines in vivo-Versuches sehr gut überein, bei dem 20 mg der kristallinen, radioaktiven Verbindung einer 165 g schweren Ratte i. p. appliziert wurden.

Der Urin wurde über 5 Stunden gesammelt. Das Tier zeigte während dieser Zeit keinerlei Vergiftungssymptome und schied mit dem Urin 72.4 % der applizierten Radioaktivität in Form des unveränderten Metaboliten I wieder aus. Die Ratte wurde anschließend getötet und perchlorsaure Extrakte von Gehirn, Leber, Milz, Niere und Blut hergestellt. Die Radioaktivität dieser Extrakte und ihrer papierchromatographisch getrennten Fraktionen lag bei so niedrigen Werten, daß eine erfolgversprechende Aufschlüsselung eventuell neu entstandener Produkte nicht möglich war. Besonders die Frage nach dem Einbau des Glucuronids in die Pyridinnucleotide wäre von Interesse. Sie konnte aber aus diesen Gründen, und weil inzwischen nicht mehr genügend Material des Metaboliten I zur Verfügung stand, um weitere klärende Versuche zu unternehmen, vorerst nicht entschieden werden.

II. Isolierung und Identifizierung von Pyridyl-N-oxyd-3-methyl-carbinol

A. Isolierung von Metabolit II

Auf die Fraktion, die den Metabolit I enthielt, folgte vom Kationenaustauscher eine nächste, die etwa 10 % der im Urin meßbaren Radioaktivität enthielt. Sie wurde ebenfalls noch mit 0.5 n HCl eluiert. Nach Konzentration durch Vakuumdestillation zeigte die Fraktion bei papierchromatographischer Trennung in System A neben 8 Unterfraktionen eine Bande mit dem Rf-Wert 0.70, die fast die gesamte Radioaktivität dieses Materials auf sich vereinte. Um diese Verbindung anzureichern, wurden zunächst die beiden entsprechenden Fraktionen der Austauscher-Säulen 1 und 2 papierchromatographisch auf ca. 180 Bogen in System A getrennt. Die Fraktion mit dem Rf-Wert 0.70 wurde herausgeschnitten, die Streifen einzeln mit H_2O eluiert, die Eluate vereint und am Vakuumdestillationsapparat vorsichtig konzentriert. Es resultierte eine braun-gelbe ölige Flüssigkeit, die durch Papierbestandteile ziemlich verunreinigt zu sein schien.

Wie Rechromatographie in System B zeigte, war die isolierte Substanz noch nicht einheitlich. In großen Serien wurde das Konzentrat darum in System B chromatographiert. Der Rf-Wert der gesuchten radioaktiven Verbindung betrug hier 0.77. Die entsprechende Bande wurde wiederum ausgeschnitten, mit H_2O eluiert und konzentriert. Obwohl ausschließlich vorgewaschene Papierbogen benutzt wurden, befanden sich auch in diesem Konzentrat wieder größere Mengen an Verunreinigungen aus dem Papier. Kristallisationsversuche in verschiedenen organischen Lösungsmitteln blieben erfolglos.

Nachdem zweifache Chromatographie auf Papier nicht zu einer sauberen Probe der gesuchten Substanz geführt hatte, wurde - wie schon bei Metabolit I - zur Dünnschicht-

chromatographie übergegangen. Das gesamte vorhandene Material des Metaboliten II wurde auf Kieselgel-Dünnschichtplatten aufgetragen. Nach Chromatographie mit dem Fließmittel des System 2 (essigsauer) zeigte sich, daß die zu reinigende Probe neben Verunreinigungen, die am Start liegen blieben, noch eine zweite, ebenfalls radioaktive Substanz mit charakteristischem UV-Spektrum enthielt (s. Abb. 22). Beide Substanzen liefen mit wenig differierenden Rf-Werten (Metabolit II = 0.40, die andere Substanz = 0.48). Im Papierchromatogramm mußten sie dagegen in System A und B gleiche Rf-Werte gehabt haben. Nach der daraufhin in grossen Serien durchgeführten dünnschichtchromatographischen Reinigung des Metaboliten II wurden beide Fraktionen getrennt weiterbehandelt. Die neue Fraktion wurde als Metabolit III bezeichnet und später als 3-Methyl-carbinol-6-pyridon identifiziert.

Die Fraktion, die Metabolit II entsprach, wurde von den Platten abgeschabt, gesammelt und anschließend mit reichlich ammoniakalischem Methanol eluiert. Nach Konzentration der Lösung wurde versucht, den Metaboliten mit Aceton/Äther auszukristallisieren. Es bildete sich ein weißer, amorpher Niederschlag, der praktisch inaktiv war und positive Ammoniakprobe ergab. Die Radioaktivität befand sich im Überstand. Bei dem Niederschlag mußte es sich um Ammoniumacetat handeln, denn hier wie bei Metabolit I war essigsauer chromatographiert und ammoniakalisch eluiert worden. Es war jedoch nicht vorherzusehen gewesen, daß solche Mengen Acetat aus dem Fließmittel am Kieselgel haften blieben.

Das gesamte Material wurde wieder in H_2O aufgenommen und über einen Anionenaustauscher (Dowex 1 x 2, OH^--Form) gegeben. Metabolit II erschien mit dem NH_4OH im Durchlauf und H_2O-Eluat. CH_3COO^- wurde gegen OH^- ausgetauscht und damit entfernt. Das in der Lösung enthaltene NH_4OH konnte nicht durch NaOH und Erwärmen ausgetrieben werden, da nicht auszuschließen war, daß dabei die unbekannte Verbindung zerstört werden könnte. Deshalb wurde das Material über eine

Kationenaustauscher-Säule (Dowex 50 x 8, H^+-Form) gegeben. Bei der fraktionierten Elution mit steigender HCl-Konzentration stellte sich allerdings heraus, daß Metabolit II und Ammoniak mit der gleichen HCl-Konzentration eluiert wurden und das Eluat damit Metabolit II und Ammonchlorid enthielt. Da der Metabolit II in Aceton relativ gut löslich zu sein schien, wurde durch wiederholte Fällung versucht, den Metaboliten von dem in Aceton schwerlöslichen Ammonchlorid zu trennen. Eine ganz befriedigende Reinigung wurde dadurch aber nicht erzielt. Außerdem war durch die vielen Behandlungsmethoden die Menge des gesuchten Stoffes erheblich zusammengeschrumpft.

Aus der Säule 3 war inzwischen neues Material zur Bearbeitung gewonnen worden. Die Fraktion, die den Metabolit II enthielt, war außerordentlich groß und enthielt neben Metabolit I noch weitere radioaktive Substanzen. Die Trennung von Metabolit I und II erfolgte über einen Anionenaustauscher (Dowex 1 x 2, OH^--Form), denn es war inzwischen bekannt, daß sich Metabolit II im Durchlauf finden mußte, Metabolit I hingegen mit 0.06 n HCl zu eluieren war. Der Durchlauf, der den Metabolit II enthielt, wurde konzentriert und auf 50 - 60 Kieselgel-Platten in System 5 von Metabolit III getrennt. Das Fließmittel wurde neutral gewählt, um die Bildung von Ammonacetat zu verhindern. Die Rf-Werte der beiden Substanzen stimmten mit denen in System 2 überein (Metabolit II = 0.40, Metabolit III = 0.48). Nach Auskratzen der Fraktionen und Elution des Metaboliten II mit ammoniakalischem Äthanol wurde das Eluat konzentriert. Es blieb eine klare Flüssigkeit zurück, die nur noch wenig Kieselgel zu enthalten schien. Das UV-Spektrum zeigte jedoch nicht völlige Übereinstimmung mit einem früher aufgenommenen. Es trat zusätzlich bei der Wellenlänge 285 mμ eine im alkalischen zu- und im sauren Milieu abnehmende kleine Extinktionsänderung auf. Ein Maximum bei 210 mμ war zudem nicht mehr so deutlich ausgeprägt.

Diese Änderung des Spektrums konnte nur auf eine Ver-

unreinigung zurückzuführen sein. Dünnschichtchromatographische Proben in verschiedenen Systemen brachten auch bald eine Trennung des Materials in zwei radioaktive Substanzen. Nach zahlreichen Versuchen mit vielen verschiedenen Fließmittelgemischen wurde schließlich in System 4 die geeignete Methode zur Trennung dieser beiden Substanzen gefunden. Die Rf-Werte differierten allerdings auch dabei nur wenig (Metabolit II = 0.29, im Gegensatz zu Rf = 0.36 der andern Substanz). Eine mit Sicherheit ausreichende Trennung wurde dann erzielt, wenn die Platten nach einmaligem Laufen und anschließendem Trocknen an der Luft ein zweites Mal dem gleichen Fließmittel ausgesetzt wurden. Beide Fraktionen wurden aus den ca. 50 Platten herausgenommen. Die abgetrennte neue radioaktive Substanz wurde als Metabolit IV bezeichnet und später als N-methyl-4-pyridon-3-carboxamid identifiziert.

Das UV-Spektrum des Metaboliten II (Abb. 14) zeigte nach Elution vom Kieselgel mit ammoniakalischem Äthanol, Konzentration und Zentrifugation bei 16000 UpM wieder allein ein breites Maximum bei 255 mμ und ein sehr scharfes Maximum bei 210 mμ.

Metabolit II aus den mittlerweile entwickelten Säulen 4 und 5 wurde ebenfalls isoliert und mit dem vorhandenen Material vereint. Bei diesen beiden Säulen trat, wie in Säule 1 und 2, der Metabolit IV nicht in den gleichen Fraktionen auf wie Metabolit II, sondern in einer späteren. Wahrscheinlich erfolgte die mangelhafte Trennung der Säule 3 durch Überschreiten der Kapazität des Austauschers.

B. Identifizierung des Metaboliten II als Pyridyl-N-oxyd-3-methyl-carbinol

Mit der konzentrierten Lösung des Metaboliten II wurden zunächst langwierige Kristallisations-Versuche durchgeführt. Sämtliche angewandten organischen Lösungsmittel

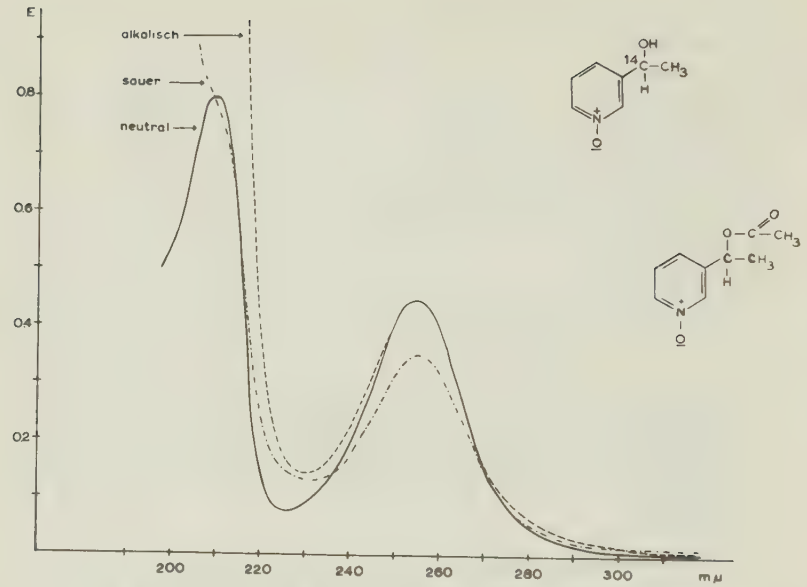


Abb. 14 UV-Spektrum von Pyridyl-N-oxyd-3-methyl-carbinol und 1-(3-Pyridyl-N-oxyd)-1-acetoxy-äthan

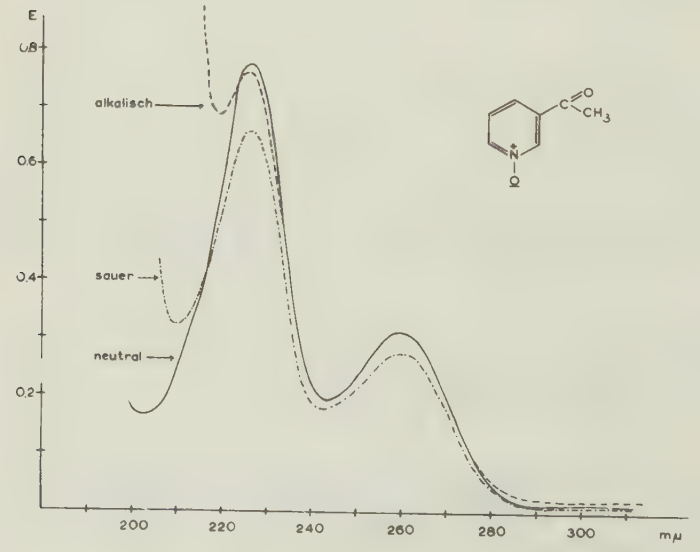


Abb. 15 UV-Spektrum von 3-Acetylpyridyl-N-oxyd

(Methanol, Äthanol, Butanol, Aceton, Äther, Benzol, Chloroform) in verschiedenen Mischungsverhältnissen brachten auch bei längerem Stehen in der Kälte keinen Erfolg.

Da in der Regel N-methylierte Pyridinverbindungen leichter kristallisieren, wurde versucht, eine Probe des Metaboliten zu N-methylieren. Dazu wurde ein Teil am Rückfluß für mehrere Stunden im alkalischen Milieu mit CH_3J gekocht. Anschließende Kristallisationsversuche förderten nur NaJ zutage, der Metabolit II blieb, wie dünnschichtchromatographische Prüfung und Aufnahme des UV-Spektrums zeigten, allein und unverändert in Lösung. Das bedeutete den wichtigen Hinweis, daß offenbar eine N-substituierte Verbindung vorliegen mußte.

Eine gewisse Ähnlichkeit des UV-Spektrums der isolierten Verbindung (Abb. 14) mit dem synthetisch hergestellten N-oxyd von 3-Acetylpyridin (Abb. 15) war schon früher aufgefallen. Dünnschichtchromatographie in System 4 zeigte aber erheblich differierende Rf-Werte des Metaboliten (0.29) im Vergleich mit synthetisiertem 3-Acetylpyridyl-N-oxyd (0.53) und Nicotinamid-N-oxyd (0.18) (Präparate von Priv.-Doz. Dr. Neuhoff, Pharm. Inst. der FU Berlin).

Der Rückstand des fehlgeschlagenen Methylierungsversuches wurde dünnschichtchromatographisch in System 4 wieder gereinigt. Auf diese Weise mußte auch das Material gereinigt werden, mit dem Versuche zum Auskristallisieren unternommen worden waren, denn Verunreinigungen aus den organischen Lösungsmitteln hatten das vorher klare, sirupöse Konzentrat tief braun gefärbt. Nach erneuter Passage über Dünnschicht-Platten in System 4, Elution mit ammoniakalischem Äthanol, Konzentration und Zentrifugation wurde der klare und farblose, sirupöse Rückstand scharf im Exsikkator getrocknet. Nach zwei Tagen blieb eine teilweise kristalline, sehr hygroskopische Substanz zurück. Der Schmelzpunkt lag bei 99 - 101°C.

Um eine Klärung der Struktur herbeizuführen, wurden ein Infrarot- und ein Kernresonanzspektrum des Metaboliten aufgenommen. Im Infrarotspektrum (Abb. 16) war die einer OH-Gruppe entsprechende starke Bande bei 3 μ zu erkennen. Für das Vorliegen einer Acetyl- oder Keto-Gruppe ergab sich kein Anhaltspunkt. Das Kernresonanzspektrum (Abb. 19) entsprach mit seinen Signalen und den durch elektrische Integration bestimmten Protonen Pyridyl-3-methyl-carbinol. Danach war mit Sicherheit auszuschließen, daß es sich bei der vorliegenden Substanz um eine N-methyl-Verbindung handeln konnte, denn es fehlte das für $-N-CH_3$ charakteristische Signal bei δ 3.6 (vgl. Abb. 26). N-Methyl-pyridyl-3-methyl-carbinol kam deshalb als Struktur des Metabolit II nicht in Frage, was außerdem schon durch die verschiedenen UV-Spektren (Abb. 4 u. 14) klargestellt war. Am Stickstoff-Atom des Pyridin-Ringes in Metabolit II mußte aber eine Addition erfolgt sein, denn die Verbindung ließ sich nicht N-methylieren. Da eine gewiße Übereinstimmung des UV-Spektrums des Metaboliten II mit dem von 3-AP-N-oxyd (Abb. 14 u. 15) und auch dem von Nicotinamid-N-oxyd bestand, mußte an das Vorliegen von Pyridyl-N-oxyd-3-methyl-carbinol gedacht werden.

Auch der Vergleich des Infrarotspektrums des Metaboliten II mit dem von synthetischem 3-AP-N-oxyd (Abb. 18) sprach für das Vorliegen eines N-oxydes. In beiden Spektren ist eine starke Bande bei 7 μ vorhanden, die dem N-oxyd zuzuordnen ist. Die der Acetylgruppe entsprechende intensive Bande des 3-AP-N-oxyds bei 5.87 μ fehlte bei der isolierten radioaktiven Verbindung. Die Annahme des Pyridyl-N-oxyd-3-methyl-carbinols hätte auch eine frühere Beobachtung erklären können, daß nämlich bei der mehrfach durchgeführten Rechromatographie des Metaboliten II öfter plötzlich auftretendes Material mit Rf-Wert und UV-Spektrum des Pyridyl-3-methyl-carbinols gesehen wurde. Dies konnte sich aus dem relativ unstabilen N-oxyd gebildet haben.

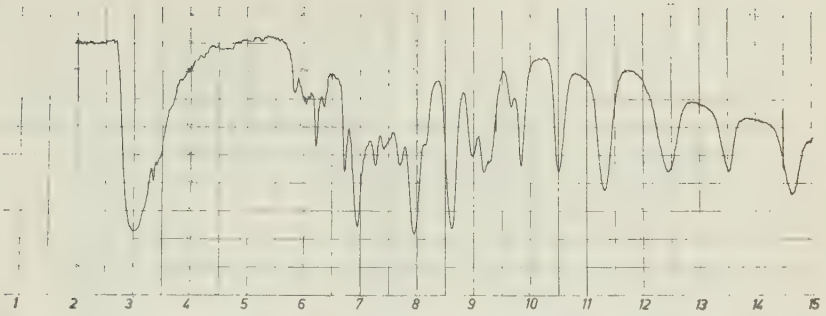


Abb. 16 IR-Spektrum von ^{14}C-Pyridyl-N-oxyd-3-methyl-carbinol

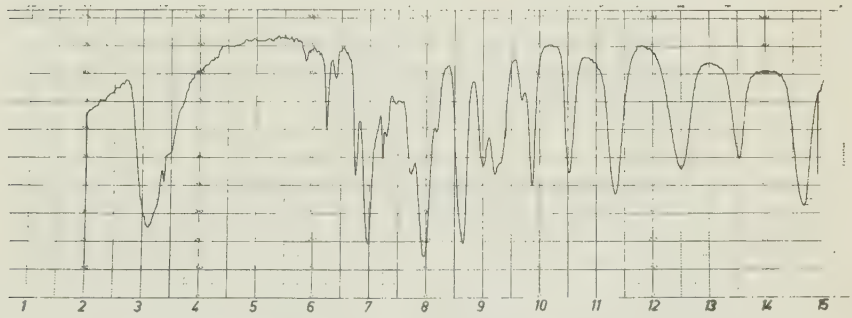


Abb. 17 IR-Spektrum von synthetischem Pyridyl-N-oxyd-3-methyl-carbinol

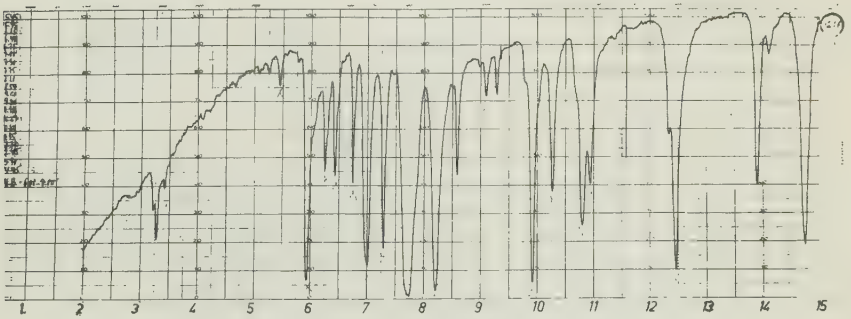


Abb. 18 IR-Spektrum von 3-Acetylpyridyl-N-oxyd

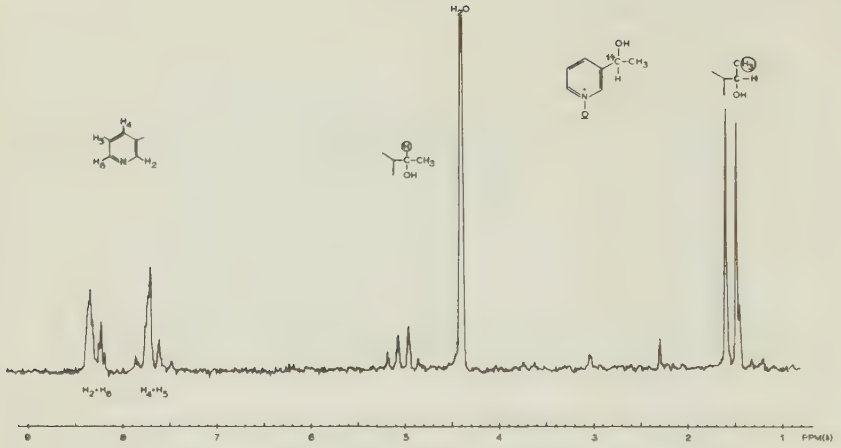


Abb. 19 Kernresonanzspektrum von ^{14}C-Pyridyl-N-oxyd-3-methyl-carbinol

Da keine Vergleichsspektren in der Literatur zu finden waren, mußte zum Beweis für die vermutete Struktur des Metaboliten II diese Substanz synthetisch hergestellt werden. Dazu wurde Pyridyl-3-methyl-carbinol in Eisessig aufgenommen, mit konz. H_2O_2 versetzt und mehrere Stunden am Rückfluß gekocht. Ein Dünnschichtchromatogramm des Reaktionsansatzes mit Fließmittel 4 zeigte, daß neben unverändertem Carbinol fünf weitere Produkte entstanden waren. Die intensivste Bande lief auf gleicher Höhe (Rf = 0.29) wie Metabolit II und wies ein vollkommen identisches UV-Spektrum auf.

Die dritte Fraktion des Chromatogrammes mit einem Rf-Wert von 0.53 hatte ein UV-Spektrum, das mit dem der Hauptfraktion ebenfalls vollkommen übereinstimmte. Um diesen auffallenden Befund zu klären, wurde zunächst ausreichend Material beider Fraktionen für die Aufnahme von Infrarot- bzw. Kernresonanzspektren dünnschichtchromatogra-

phisch isoliert und im Exsikkator getrocknet. Das hauptsächliche Syntheseprodukt mit dem gleichen Rf-Wert wie Metabolit II war nach dem Infrarotspektrum mit dem Metabolit II identisch (Abb. 16 u. 17). Demnach handelt es sich bei dem Metabolit II um das N-oxyd des Pyridyl-3-methylcarbinols. Auf diese Verbindung entfallen ca. 10 % der mit

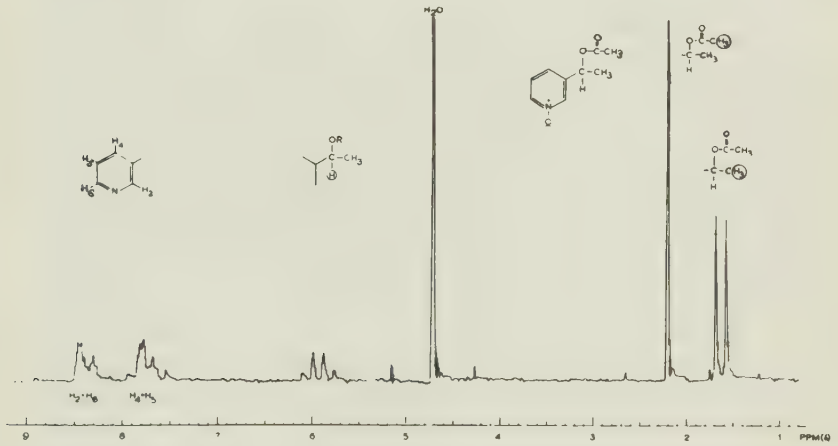


Abb. 20 Kernresonanzspektrum von 1-(3-Pyridyl-N-oxyd)-1-acetoxy-äthan

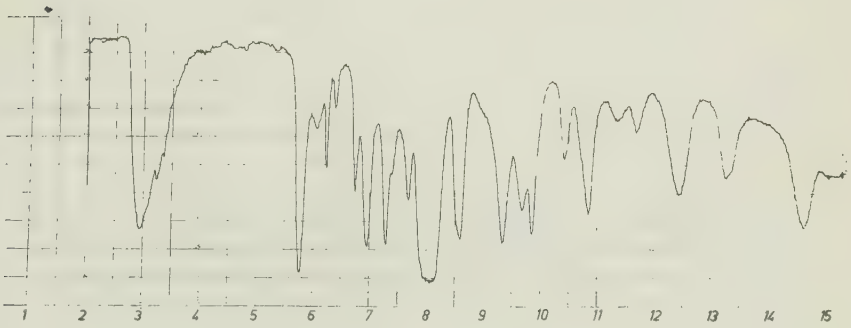


Abb. 21 IR-Spektrum von 1-(3-Pyridyl-N-oxyd)-1-acetoxy-äthan

dem Urin ausgeschiedenen ^{14}C-Aktivität nach Gabe von ^{14}C-3-Acetylpyridin.

Die andere synthetisierte Substanz mit dem gleichen UV-Spektrum wie das Pyridyl-N-oxyd-3-methyl-carbinol und Rf = 0.53 war nach dem Infrarotspektrum (Abb. 21) nicht mit dem Pyridyl-N-oxyd-3-methyl-carbinol identisch, denn es fand sich hier bei 5.77 µ eine starke Bande, die einer Keto- oder Acetylgruppe zugeordnet werden kann. Nach dem Kernresonanzspektrum (Abb. 20) wurde die Verbindung als der Essigsäureester des Pyridyl-N-oxyd-3-methyl-carbinols, 1-(3-Pyridyl-N-oxyd)-1-acetoxy-äthan, identifiziert. Diese Verbindung ist zusätzlich bei der Oxydation im essigsauren Milieu aus dem Pyridyl-3-methyl-carbinol entstanden. Die Identität des UV-Spektrums mit dem des N-oxyds vom Pyridyl-3-methyl-carbinol zeigt, wie auch schon bei Metabolit I gesehen wurde, daß eine Substitution des H-Atoms der alkoholischen OH-Gruppe des Carbinols durch Verbindungen, die selbst keine UV-Absorption haben, keinen Einfluß auf das chromophore System der Verbindung hat.

III. Isolierung und Identifizierung von Metabolit III als 3-Methyl-carbinol-6-pyridon

A. Isolierung von Metabolit III

Bei der dünnschichtchromatographischen Reinigung des Metaboliten II in System 2 war eine Fraktion abgetrennt worden (s. S. 31), die sich sowohl am Kationenaustauscher als auch im Papierchromatogramm in System A und B völlig gleich verhalten hatte wie Metabolit II. Der auf diese Substanz entfallende prozentuale Anteil an der mit dem Urin ausgeschiedenen Radioaktivität lag bei 0.5 bis 1 %. Das UV-Spektrum (Abb. 22) der Substanz hat in neutraler wäßriger Lösung bei 297 mμ und 226 mμ zwei Maxima und bei 247 mμ und 210 mμ zwei Minima, die sich im alkalischen und sauren Milieu zusammen mit Extinktionsänderungen charakteristisch verschieben.

Das dünnschichtchromatographisch in System 2 gewonnene Material wurde nach Elution vom Kieselgel mit ammoniakalischem Methanol durch Destillation konzentriert. Wie beim gleichzeitig behandelten Metabolit II zeigte sich, daß eine erhebliche Menge Ammonacetat gebildet worden war. Deshalb wurde auch Metabolit III über einen Anionenaustauscher vom Acetat befreit. Der Metabolit erschien im Durchlauf.

B. Identifizierung des Metaboliten III als 3-Methyl-carbinol-6-pyridon

Auffallend war die sehr große Ähnlichkeit des UV-Spektrums des Metaboliten III (Abb. 22) mit dem des 6-Hydroxypyridins (Abb. 23). Eine gewisse Ähnlichkeit bestand auch mit den UV-Spektren von N-Methyl-3-carboxamid-2-pyridon und 6-methyl-3-cyano-2-pyridon. Auch diese Verbindungen haben zwei weit auseinanderliegende Maxima. Jedoch ist bei diesen beiden 2-Pyridonen die Extinktion bei dem Maxi-

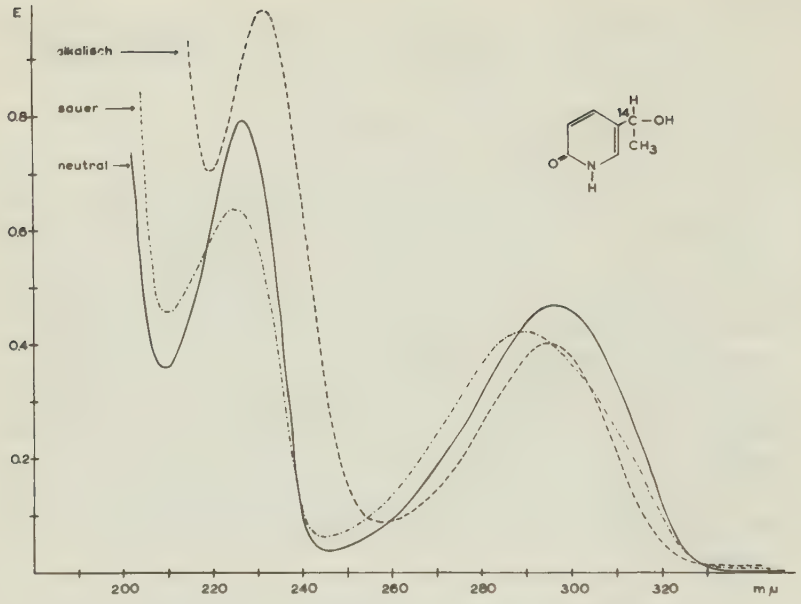


Abb. 22 UV-Spektrum von ^{14}C-3-Methyl-carbinol-6-pyridon

mum der längeren Wellenlänge höher als bei dem zweiten Maximum der kurzen Wellenlänge. Beim 6-Hydroxypyridin dagegen ist genau wie bei Metabolit III das kurzwellige Maximum höher als das Maximum bei der längeren Wellenlänge. Das legte den Verdacht nahe, daß es sich bei dem isolierten Metaboliten III um ein 6-Pyridon handeln könnte. Eine Ähnlichkeit des UV-Spektrums mit dem von Neuhoff und Harris (1964) isolierten 3-Acetyl-6-pyridon bestand allerdings nicht.

Von dieser Überlegung ausgehend wurde versucht, das 6-Pyridon des N-Methyl-pyridyl-3-methyl-carbinols zu synthetisieren. Es wurde dazu N-Methyl-pyridyl-3-methyl-carbinol in wäßriger Lösung mit überschüssigem Kaliumferricyanid in alkalischem Milieu fünf Stunden bei 80°C inkubiert. Anschließende Dünnschichtchromatographie des Reak-

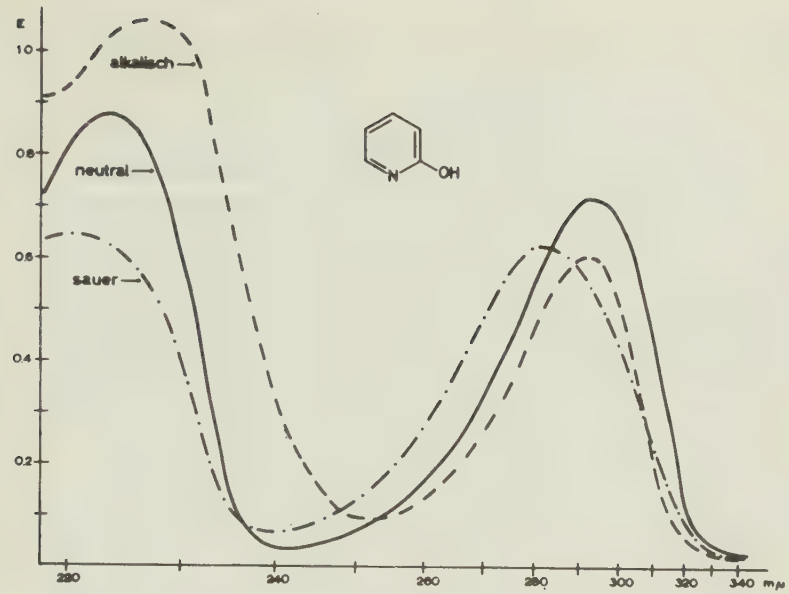


Abb. 23 UV-Spektrum von 6-(2)-Hydroxypyridin

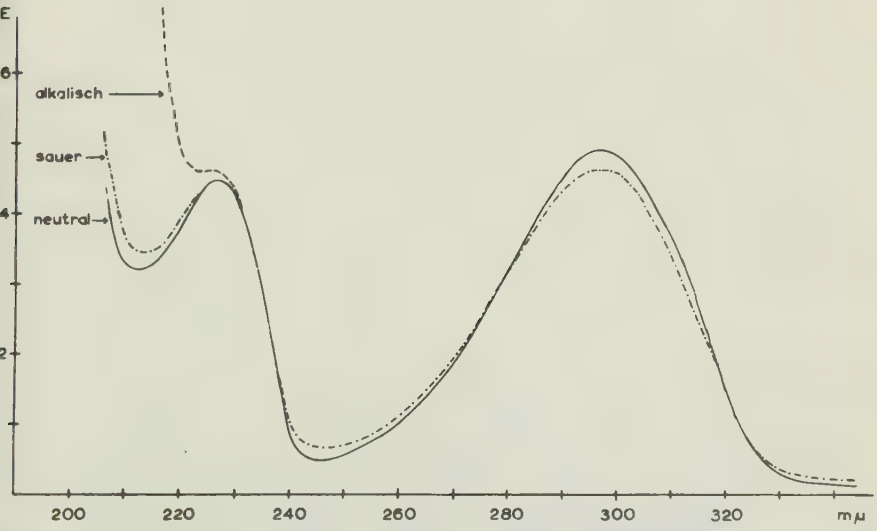


Abb. 24 UV-Spektrum von N-Methyl-3-methyl-carbinol-2-pyridon

tionsgemisches in System 4 zeigte, daß zwei Hauptfraktionen entstanden waren mit Rf-Werten von 0.47 bzw. 0.66.

Das UV-Spektrum der Verbindung mit Rf = 0.66 zeigt Abb. 24. Auf eine genaue Identifizierung wurde verzichtet, da nur wenig Material zur Verfügung stand. Es handelt sich aber mit großer Wahrscheinlichkeit um das 2-Pyridon des N-Methyl-pyridyl-3-methyl-carbinols. Dafür spricht einerseits das UV-Spektrum und andererseits der hohe Rf-Wert. Denn aus früheren Untersuchungen (Neuhoff, pers. Mitteilung) war bekannt, daß 2-Pyridone bei der Dünnschichtchromatographie schneller wandern als 6-Pyridone.

Das UV-Spektrum des Syntheseproduktes mit Rf = 0.47 (Abb. 25) war mit dem des Metaboliten III in neutraler, wäßriger Lösung nahezu identisch. Die Maxima beider Ver-

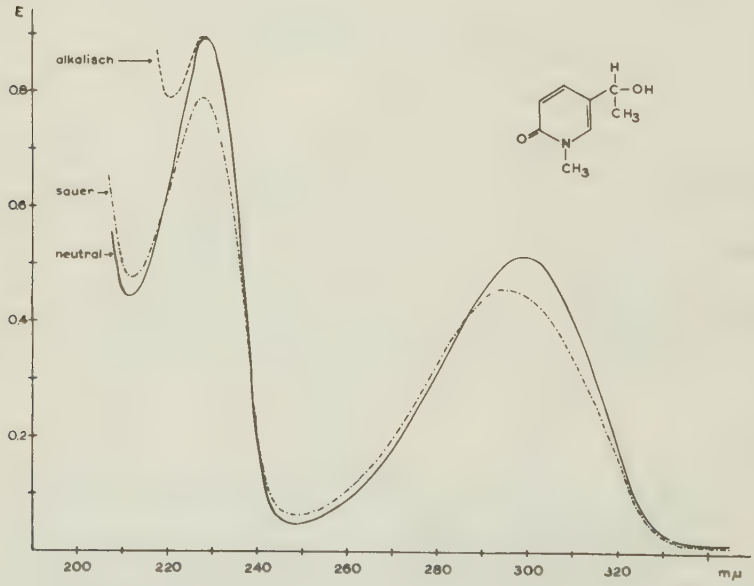


Abb. 25 UV-Spektrum von synthetischem N-Methyl-3-methyl-carbinol-6-pyridon

bindungen unterschieden sich nur um 2 mμ. Die Minima waren gleich. Die Änderung der Wellenlängen und der Extinktion in alkalischer und saurer Lösung waren bei der synthetisierten Verbindung jedoch wesentlich weniger ausgeprägt als bei Metabolit III. Diese Vereinheitlichung des UV-Spektrums der Pyridinverbindungen in verschiedenen pH-Bereichen kann immer dann beobachtet werden, wenn eine Addition am Stickstoff des Pyridinringes erfolgt ist. Auch die minimale Verschiebung der Maxima ist auf die Methyladdition am N zurückzuführen. Ein gleichartiges Verhalten wurde auch nach der N-Methylierung von Pyridyl-3-methylcarbinol beobachtet (vgl. Abb. 2 u. 4).

Daher lag der Gedanke nahe, daß die synthetisierte Verbindung dem N-methylierten Metaboliten III entsprechen könnte.

Eine kleine Probe des Metaboliten III wurde daraufhin in alkoholischer Lösung bei alkalischem pH einige Stunden am Rückfluß mit CH_3J gekocht. Dünnschichtchromatographische Trennung des Reaktionsgemisches in System 4 zeigte zwei Fraktionen. Fortgesetztes Kochen der Probe über 12 Stunden führte zur vollständigen Zerstörung des Metaboliten, denn es war danach im Dünnschichtchromatogramm keine UV-positive Fraktion mehr zu erkennen. Von den beiden nach wenigen Stunden Kochen gefundenen Fraktionen wies eine einen Rf-Wert von 0.81 auf. Sie wurde nicht weiter untersucht. Die zweite lief mit dem beschriebenen Syntheseprodukt auf gleicher Höhe (Rf = 0.47). Das UV-Spektrum dieses Stoffes zeigte völlige Übereinstimmung mit dem des synthetisierten Produktes.

Aus der Synthese wurde nun genügend sauberes Material durch Chromatographie in System 4 und zweifache Rechromatographie in System 1 und 5, Elution mit absolutem, ammoniakalischem Äthanol, Konzentration, Zentrifugation und Trocknen im Exsikkator gewonnen. Von dieser Probe wurde ein Kernresonanz- und ein Infrarotspektrum aufgenommen (Abb. 26 u. 27). Im Infrarotspektrum (Abb. 27) ist die gleiche in-

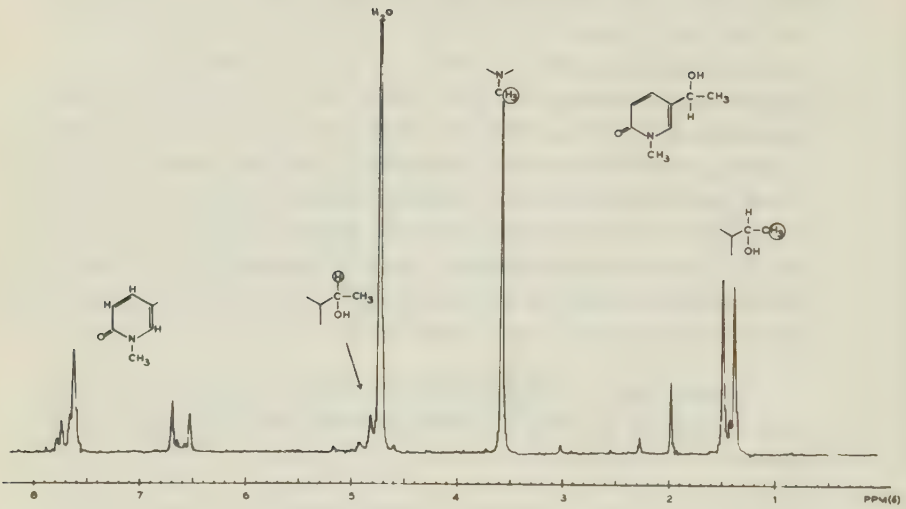


Abb. 26 Kernresonanzspektrum von synthetischem N-Methyl-3-methyl-carbinol-6-pyridon

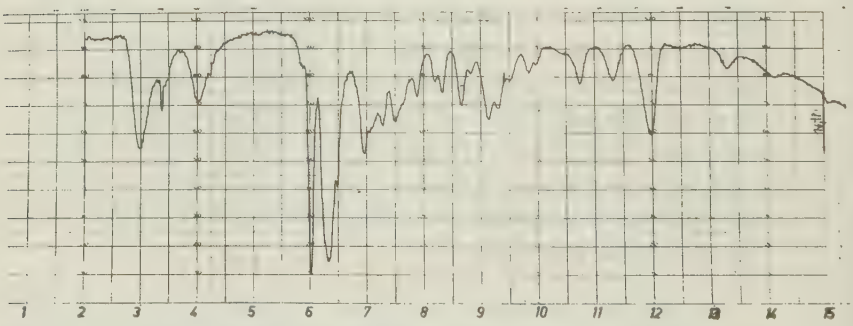


Abb. 27 IR-Spektrum von synthetischem N-Methyl-3-methyl-carbinol-6-pyridon

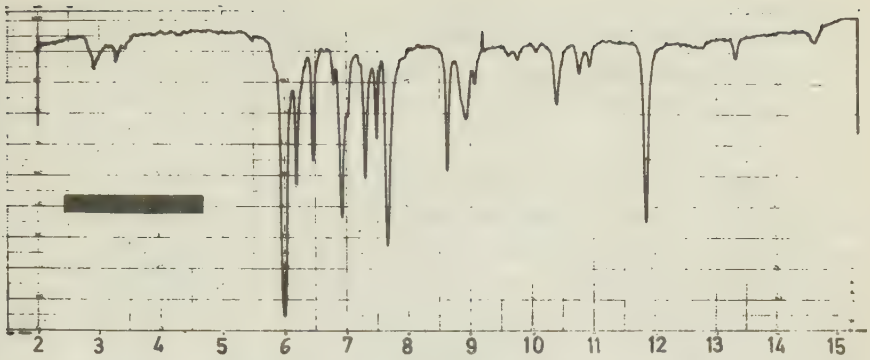


Abb. 28 IR-Spektrum von N-Methyl-3-acetyl-6-pyridon (Neuhoff u. Harris 1964)

tensive Bande bei 6 µ zu erkennen, die auch im Infrarotspektrum des von Neuhoff und Harris (1964) veröffentlichten Spektrums des N-Methyl-3-acetyl-6-pyridons auftritt (vgl. Abb. 28). Das Kernresonanzspektrum (Abb. 26) bestätigte das Vorliegen des 6-Pyridon vom N-Methyl-pyridyl-3-methyl-carbinol.

Weitere Spektren des Metaboliten III zum Vergleich mit dem Syntheseprodukt konnten wegen der geringen Menge der Substanz und der zusätzlich bei der Aufarbeitung eingetretenen Verluste nicht aufgenommen werden.

Aufgrund der Identität der UV-Spektren von synthetischem N-Methyl-3-methyl-carbinol-6-pyridon und dem des N-methylierten Naturproduktes, sowie auch der Identität der Rf-Werte dieser beiden Verbindungen bei der Dünnschichtchromatographie, ist mit größter Wahrscheinlichkeit festzustellen, daß es sich bei diesem Metabolit III um das 3-Methyl-carbinol-6-pyridon handelt.

IV. Isolierung und Identifizierung von Metabolit IV als N-Methyl-3-carboxamid-4-pyridon

A. Isolierung von Metabolit IV

Nach der Fraktion mit Metabolit II und III kam von den Kationenaustauscher-Säulen meistens eine Fraktion, die zwei ziemlich radioaktive Verbindungen enthielt. Die eine dieser beiden Substanzen war bei der Aufarbeitung des Metaboliten II aus der schlecht getrennten Säule 3 zuerst aufgefallen (vgl. S. 33). Von Metabolit II wurde sie durch zweimaliges Laufen im dünnschichtchromatographischen System 4 getrennt. Nach Elution vom Kieselgel mit ammoniakalischem Äthanol, Konzentration und Zentrifugation für 1/2 Stunde bei 16000 UpM wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und mit wenig Äthanol und Aceton versetzt. Anschließend wurde Äther zugefügt und die Lösung über Nacht im Kühlschrank belassen. Es bildeten sich weiße, nadelförmige Kristalle. Diese wurden von der Mutterlauge getrennt und noch einmal aus einem gleichen Gemisch von Lösungsmitteln umkristallisiert.

B. Identifizierung des Metaboliten IV als N-Methyl-3-carboxamid-4-pyridon

Das UV-Spektrum der kristallinen, radioaktiven Substanz (Abb. 29) stimmte vollkommen überein mit dem von Wu Chang (1959) veröffentlichten Spektrum des N-Methyl-3-carboxamid-4-pyridon. Auch das Infrarotspektrum (Abb. 30) der isolierten Verbindung entspricht dem Infrarotspektrum, das Wu Chang (1959) angegeben hat. Das N-Methyl-3-carboxamid-4-pyridon wird von Wu Chang als ein Hauptmetabolit der Nicotinsäure beschrieben und wurde von ihm aus dem Urin von Ratten isoliert, denen Nicotinsäure appliziert wurde. Da 3-Acetylpyridin (McKennis, 1964) zu Nicotinsäure umgesetzt werden kann, ist es nicht überraschend, daß wir N-Methyl-

3-carboxamid-4-pyridon gefunden haben. Auf diese Verbindung, die als Metabolit des 3-Acetylpyridins bislang noch nicht beschrieben war, entfallen 1 - 2 % der mit dem Urin ausgeschiedenen ^{14}C-Radioaktivität nach Gabe von ^{14}C-3-Acetylpyridin.

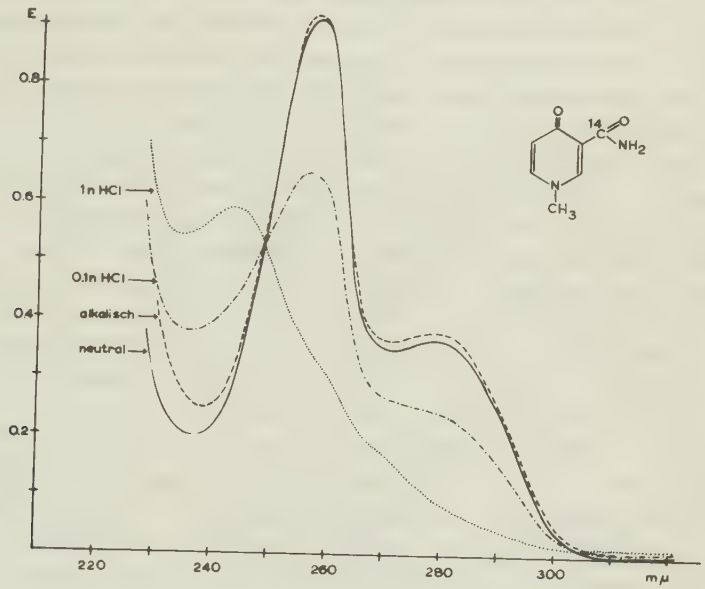


Abb. 29 UV-Spektrum von ^{14}C-N-Methyl-3-carboxamid-4-pyridon

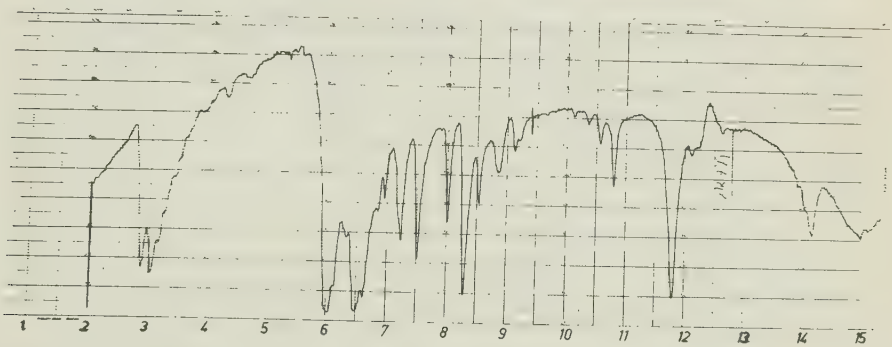


Abb. 30 IR-Spektrum von ^{14}C-N-Methyl-3-carboxamid-4-pyridon

V. Isolierung und Identifizierung von Pyridyl-3-methyl-carbinol

Mit dem Metaboliten IV in einer Fraktion wurde von der Mehrzahl der Kationenaustauscher-Säulen gleichzeitig eine zweite Substanz eluiert, die papier- bzw. dünnschicht-chromatographisch gereinigt wurde und die nicht am Anionen-austauscher haften blieb. Durch Vergleich mit authentischem, synthetisiertem Material konnte sie als Pyridyl-3-methyl-carbinol identifiziert werden. Die Rf-Werte im Papierchro-matogramm in System A (= 0.93) und System C (= 0.76) stimmten völlig überein, das gleiche war im dünnschicht-chromatographischen System 4 zu beobachten (Rf = 0.73). Vollkommene Identität zeigten auch die UV-Spektren (Abb. 2).

Um die Identität weiter zu bestätigen, wurde ausrei-chend radioaktives Pyridyl-3-methyl-carbinol angereichert und durch mehrstündiges Kochen am Rückflußkühler mit CH_3J bei alkalischem pH am Stickstoff methyliert. Der Reaktions-ansatz wurde dünnschichtchromatographisch in System 8 ge-reinigt. Die daraus isolierte radioaktive Verbindung hatte ein UV-Spektrum, das mit dem von synthetischem N-Methyl-pyridyl-3-methyl-carbinol vollkommen identisch war (s. Abb. 4).

Bei dieser aus dem Urin isolierten Verbindung handelt es sich demnach einwandfrei um Pyridyl-3-methyl-carbinol, das mit 4 - 5 % an der mit dem Urin ausgeschiedenen Radio-aktivität beteiligt ist.

VI. Isolierung und Identifizierung von N-Methyl-3-carboxamid-6-pyridon

Bei dünnschichtchromatographischer Prüfung der mit H_2O vom Kationenaustauscher eluierbaren Fraktionen fand sich der von Neuhoff und Harris (1964) gefundene Metabolit 3-Acetyl-6-pyridon. Daneben fiel nach alkoholischer Extraktion des H_2O-Eluates eine weitere radioaktive Verbindung auf.

Zur Isolierung dieser Substanz wurde der Alkoholextrakt der getrockneten Fraktion auf 20 Kieselgel-Platten in System 1 getrennt, die entsprechende Bande (Rf = 0.46) herausgenommen und mit absolutem Äthanol eluiert. Nach Einengen des Eluates und Abzentrifugieren der Kieselgelreste bei 16000 UpM ergab sich ein UV-Spektrum, das dem von N-Methyl-3-carboxamid-6-pyridon vollkommen glich (Abb. 31 bzw. 32).

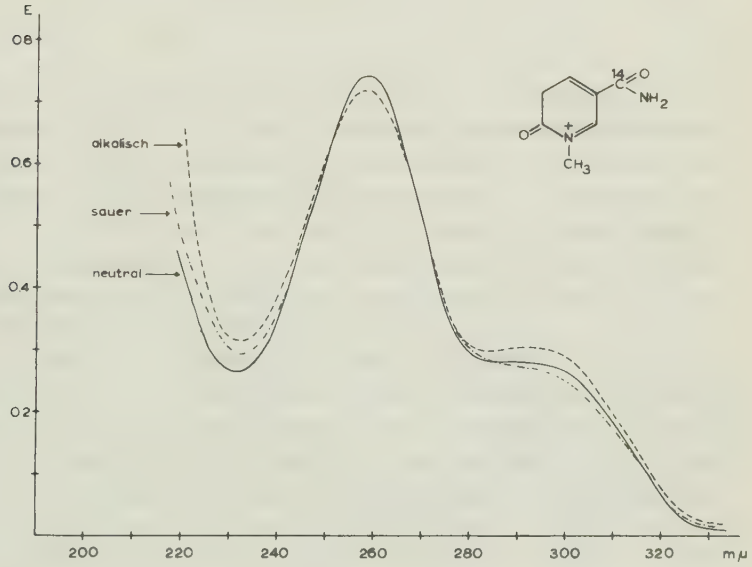


Abb. 31 UV-Spektrum von ^{14}C-N-Methyl-3-carboxamid-6-pyridon

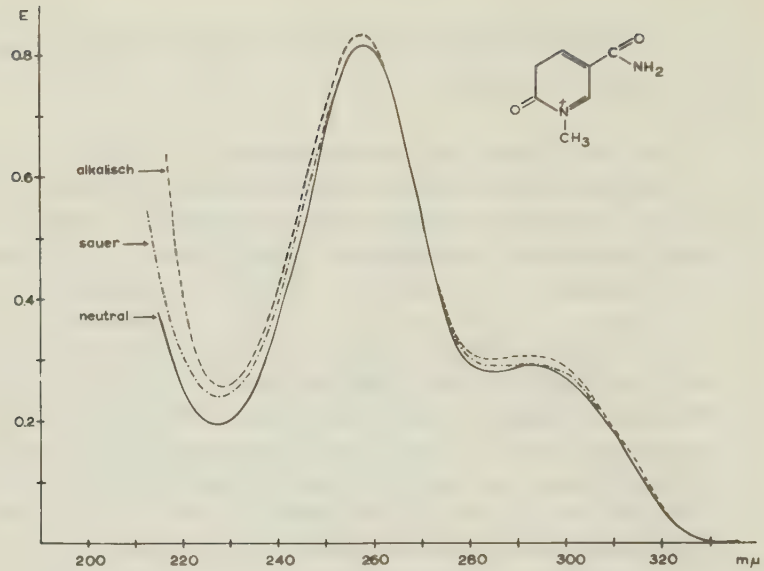


Abb. 32 UV-Spektrum von synthetischem N-Methyl-3-carboxamid-6-pyridon

Bei dünnschichtchromatographischem Vergleich mit authentischer Substanz (Califor. Corp. f. Biochem. Research, Los Angeles) in den Systemen 2, 4 und 5 ergaben sich jedesmal identische Rf-Werte beider Substanzen (0.61, 0.36 bzw. 0.52). Dieser Metabolit ist aus dem Stoffwechsel des Nicotinamid bekannt (Leifer et al., 1951). Da 3-Acetylpyridin im Organismus zu Nicotinamid umgesetzt werden kann (Gaebler, Beher - 1951), war auch das N-Methyl-3-carboxamid-6-pyridon theoretisch zu erwarten. Beher et al. (1953 u. 1959) haben es als Metabolit nach 3-Acetylpyridin-Applikation gefordert, aber bisher nicht nachgewiesen. 1 - 2 % der mit dem Urin ausgeschiedenen Radioaktivität nach Gabe von ^{14}C-3-Acetylpyridin entfallen auf diese Verbindung.

D I S K U S S I O N

Aus dem Urin von Ratten, die mit 3-Acetylpyridin behandelt wurden, konnten die folgenden sechs Verbindungen isoliert und identifiziert werden:

Pyridyl-3-methyl-carbinol-glucuronid	35 - 40 %
Pyridyl-N-oxyd-3-methyl-carbinol	10 %
Pyridyl-3-methyl-carbinol	4 - 5 %
3-Methyl-carbinol-6-pyridon	0.5 - 1 %
N-Methyl-3-carboxamid-6-pyridon	1 - 2 %
N-Methyl-3-carboxamid-4-pyridon	1 - 2 %
	51.5 - 60 %

Die Prozentzahlen entsprechen dem Anteil der jeweiligen Verbindung an der insgesamt mit dem Urin ausgeschiedenen Radioaktivität nach Gabe von ^{14}C-3-Acetylpyridin. Wenn die von Neuhoff und Harris (1964) bereits isolierten Metaboliten 3-Acetyl-6-pyridon (25 %) und N-Methyl-3-acetyl-6-pyridon (0.3 %) noch hinzugezählt werden, können insgesamt 76.8 - 85.3 % der nach Gabe von ^{14}C-3-AP mit dem Urin ausgeschiedenen Radioaktivität 8 Metaboliten zugeordnet werden. Von diesen identifizierten Verbindungen war bis auf Pyridyl-3-methyl-carbinol (McKennis et al., 1964, Kanig u. a., 1964) keine als Metabolit des 3-AP bekannt. Sowohl Beher (1953) als auch McKennis (1964) haben die Existenz eines Pyridyl-3-methyl-carbinol-glucuronids vermutet, aber diese Verbindung bisher weder isoliert noch identifiziert.

Das hauptsächliche Stoffwechselprodukt des 3-AP ist mit 35 - 40 % der ausgeschiedenen Radioaktivität das Glucuronid des Pyridyl-3-methyl-carbinols. Werden zu diesen 35 - 40 % noch das freie Carbinol (4 - 5 %), das Pyridyl-N-oxyd-3-methyl-carbinol (10 %) und das 6-Pyridon des Carbinols (0.5 - 1 %) zugezählt, so entfallen etwa 50 - 56 % der Gesamtradioaktivität auf Pyridyl-3-methyl-carbinol und Reaktionsprodukte dieser Verbindung. Dieser Befund steht im Wi-

derspruch zu der Annahme von Beher (1953), daß 3-AP nur langsam zu Carbinol reduziert werden könnte. Quantitative Angaben über den Umfang der Carbinol-Bildung finden sich weder bei Beher noch bei McKennis. Nach unsern Analysenergebnissen muß vielmehr angenommen werden, daß die Reduktion der Ketogruppe des 3-Acetylpyridins zum Carbinol der bevorzugte Abbauweg ist.

Kanig, Koransky u. a. (1964) haben bei ihrer Untersuchung des 3-AP-Stoffwechsels im ZNS von den 0.7 % der im Gehirn nach Applikation von ^{3}H-markiertem 3-AP nachweisbaren Radioaktivität 56 % dem Pyridyl-3-methyl-carbinol zuordnen können. Aufgrund dieses Befundes und der Beobachtung, daß die Applikation von Pyridyl-3-methyl-carbinol fast die gleichen Vergiftungssymptome verursachte wie sie nach Gabe von 3-AP auftreten, kommen die Autoren zu dem Schluß, daß dieser Metabolit des 3-AP eine eigene Rolle bei der Ausbildung der toxischen Symptome nach Gabe von 3-AP spielen kann. Die vorwiegend zentralnervösen Störungen, die nach der Applikation von 3-AP auftreten, sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Bildung abnorm strukturierter Pyridinnucleotide zurückzuführen, die 3-AP an Stelle von Nicotinamid im Molekül enthalten. (Übersicht bei Coper und Herken, 1963, Herken, 1965) Ein Pyridyl-3-methyl-carbinol-Nucleotid konnte zwar in vitro synthetisiert (Kaplan u. Ciotti, 1956, Brunnemann u. Coper, 1964), in vivo bisher aber nicht nachgewiesen werden.

Unsere Analysenergebnisse sprechen dagegen, daß dem Pyridyl-3-methyl-carbinol eine wesentliche Bedeutung bei der 3-AP-Vergiftung zukommt. Zum weitaus überwiegenden Teil wird es glucuronidiert und dadurch entgiftet. Da der Pyridin-Stickstoff der Glucuronsäureverbindung noch additionsfähig ist, kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß auch das Glucuronid noch gegen Nicotinamid in den Pyridinnucleotiden ausgetauscht werden kann. Wenn dieser Austausch einen nennenswerten Umfang erreichen würde, könnte das auch Störungen im Wasserstofftransport der Zellen zur Folge ha-

ben. Wir haben versucht, diese Frage durch einen orientierenden in-vivo-Versuch zu klären. Dafür war das von uns als Diacetonid isolierte Glucuronid des Pyridyl-3-methyl-carbinols besonders gut geeignet, denn die Acetonanlagerung an das Glucuronsäuremolekül verhindert die Hydrolyse der Verbindung durch Glucuronidase zur freien Glucuronsäure und zum Carbinol. Wenn also nach der Applikation des ^{14}C-Carbinol-glucuronsäure-diacetonids Radioaktivität in den Organen nachweisbar ist, konnte sie nur von der unveränderten Verbindung stammen. Bereits in den 5 Stunden der Versuchsdauer wurden 73 % der applizierten ^{14}C-Radioaktivität unverändert mit dem Urin ausgeschieden. In keinem Organ (Leber, Niere, Gehirn, Milz, Blut) war mehr als höchstens 1 % der injizierten Aktivität nachweisbar. Eine Zuordnung dieser ^{14}C-Radioaktivität zu bestimmten Pyridinnucleotiden war wegen der geringen Radioaktivität nicht möglich. Es ist danach sehr unwahrscheinlich, daß das Carbinol-glucuronid in größerem Umfang in die Pyridinnucleotide eingebaut werden kann.

Ein weiterer wesentlicher Anteil des Pyridyl-3-methyl-carbinols wird zum N-oxyd umgesetzt. Diese Verbindung kann wegen der Sauerstoffaddition am Pyridin-N nicht in die Nucleotide eingebaut werden. Dementsprechend wird auch die Applikation von 50 oder 100 mg/kg Pyridyl-N-oxyd-3-methyl-carbinol symptomlos vertragen.

Ein kleiner Teil des Carbinols wird auch zum 6-Pyridon oxydiert. Harris (1965) hat festgestellt, daß das 6-Pyridon des 3-Acetylpyridins nicht mehr toxisch ist. Sehr wahrscheinlich wird also auch das 6-Pyridon vom Carbinol nicht toxisch sein.

Von den insgesamt 56 %, die auf das Pyridyl-3-methyl-carbinol entfallen, bleiben also nur 4 - 5 % für freies Carbinol übrig, das Kanig u. a. toxisch fanden. Sie haben allerdings diese Verbindung in der gleichen hohen Dosierung von 100 mg/kg appliziert wie 3-AP. Die toxischen Symptome,

die danach auftreten, sind sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß das Carbinol bei dieser hohen Dosis nicht schnell genug glucuronidiert und oxydiert werden kann. Appliziert man nämlich Ratten nur die 5 mg/kg, die nach unserer Analyse als freies Carbinol ausgeschieden wurden, treten keinerlei Vergiftungssymptome auf. Auch die doppelte Menge von 10 mg/kg wird symptomlos vertragen. Es ist daher anzunehmen, daß die Reduktion von 3-AP zum Carbinol und die Bildung des Carbinol-glucuronids bzw. die Oxydation zum N-oxyd und 6-Pyridon ganz kontinuierlich ineinander übergehen. Dadurch ist nur so wenig an freiem Carbinol im Organismus vorhanden, daß es keinen entscheidenden Einfluß auf den Verlauf der 3-AP-Vergiftung haben kann. Hinzu kommt außerdem, daß dieses freie Carbinol - ganz im Gegensatz zum freien 3-AP - mit dem Urin ausgeschieden werden kann.

Zwei der von uns isolierten und identifizierten Metaboliten (N-Methyl-3-carboxamid-6-pyridon und N-Methyl-3-carboxamid-4-pyridon) waren als Stoffwechselprodukte des Nicotinamids (Leifer et al., 1951) bzw. der Nicotinsäure (Wu Chang, 1959) bekannt. Sowohl Beher et al. (1952) als auch McKennis et al. (1964) haben die Bildung von Nicotinamid aus 3-AP nachgewiesen. Neuhoff (1964) fand nach Gabe von ^{14}C-3-AP nur 0.006 % der applizierten Radioaktivität als ^{14}C-Nicotinamid in den Nucleotiden des Gehirns. Diese Umwandlung kann also kein wesentlicher Abbauweg des 3-AP bei Ratten sein. Einerseits entfallen auf die Metaboliten des Nicotinamids bzw. der Nicotinsäure nur je 1 - 2 % der applizierten 3-AP-Dosis und andererseits ist unter den restlichen 15 - 20 % noch unaufgeklärter Radioaktivität keine Verbindung enthalten, die mehr als 5 % der ^{14}C-Aktivität repräsentiert. Da Nicotinsäure, Nicotinamid und N-Methylnicotinamid als Metaboliten des 3-AP bekannt waren, wurde nicht gezielt nach ihnen gesucht. Wir haben auch keine dieser Substanzen im Urin gefunden. Wenn auf eine dieser Verbindungen jedoch ein wesentlicher Anteil der ^{14}C-Aktivität entfallen wäre, wäre sie uns mit Sicherheit nicht entgangen. Die Entgiftung von 3-AP durch Umwandlung in Nicotinamid

oder Nicotinsäure ist für den Verlauf der 3-AP-Vergiftung daher ohne große Bedeutung. Diese Frage ist deshalb von gewissem Interesse, weil Nicotinamid in einem kompetitiven Antagonismus zum 3-AP stehen kann (Übersicht bei Coper und Herken, 1963, Neuhoff, 1964) und durch Erhöhung der Nicotinamid-Konzentration im Gewebe die 3-AP-Vergiftung abgeschwächt oder unterdrückt werden kann.

Das Ergebnis unserer Analyse erlaubt den Schluß, daß mit großer Wahrscheinlichkeit das Vergiftungsbild der 3-Acetylpyridinintoxikation allein auf die Anwesenheit des 3-Acetylpyridinmoleküls im Organismus zurückzuführen ist, und daß den Stoffwechselprodukten des 3-AP keine entscheidende Bedeutung für den Verlauf der 3-Acetylpyridinvergiftung zukommt.

Die Identifizierung der Metaboliten des 3-AP kann abgesehen von der Klärung ihrer Rolle bei der 3-AP-Vergiftung noch aus anderen Gründen theoretisches Interesse beanspruchen. Beher et al. (1953) haben beschrieben, daß im Urin kein unverändertes 3-AP nachzuweisen ist. Neuhoff (1964) hat diesen Befund bestätigt und auch nach der sehr hohen Dosis von 1000 mg/kg kein freies 3-AP im Urin, aber gleichzeitig reichlich 3-AP in der Niere gefunden. Alle in der Literatur beschriebenen und ebenso die von uns identifizierten Metaboliten wurden aus dem Urin isoliert, d. h. sie wurden durch die Niere ausgeschieden. Warum 3-AP nicht durch dieses Organ eleminiert werden kann, ist bisher noch nicht untersucht worden. Die Aufklärung dieses auffälligen Befundes kann dazu beitragen, unsere Kenntnisse über enzymatische Umsetzungen in der Tubuluszelle zu erweitern. Die Messung des tubulären Transportes des 3-AP und seiner Metaboliten könnte darüber hinaus zur Bestimmung der physikalisch-chemischen Eigenschaften tubulärer Membranen herangezogen werden.

Die ersten Untersuchungen über die Wirkungen von 3-AP (Kaplan et al., 1954) gingen u. a. von der Vorstellung aus,

daß 3-AP als Antimetabolit des Nicotinamids einen hemmenden Einfluß auf das Wachstum von Tumoren haben könnte. Da sich aber 3-AP als zu toxisch erwies, wurde dieser Gedanke nicht weiter verfolgt. Es erscheint aber nicht ausgeschlossen, daß Metaboliten des 3-AP, die kaum mehr toxisch sind, oder chemisch noch etwas veränderte Stoffwechselprodukte eine Störung im Stoffwechsel verursachen können, wenn sie in bestimmten Zellen oder Zellfraktionen angereichert werden. Dieses Prinzip der selektiven Vulnerabilität könnte als Grundlage für die Entwicklung von Pharmaka mit carcinostatischer Wirkung dienen.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird die Isolierung von Stoffwechselprodukten des 3-Acetylpyridins aus dem Urin von Ratten beschrieben. Die folgenden sechs Verbindungen konnten identifiziert werden:

1.) Pyridyl-3-methyl-carbinol-glucuronid (35 - 40 %). Diese Substanz wurde als das Ammoniumsalz der Pyridyl-3-methyl-carbinol-1,2:4,5-diisopropyliden-glucuronsäure isoliert. Die Diisopropyliden-Verbindung ist während der Aufarbeitung durch Anlagerung von Aceton an die Glucuronsäure entstanden.
2.) Pyridyl-N-oxyd-3-methyl-carbinol (10 %)
3.) Pyridyl-3-methyl-carbinol (4 - 5 %)
4.) 3-Methyl-carbinol-6-pyridon (0.5 - 1 %)
5.) N-Methyl-3-carboxamid-6-pyridon (1 - 2 %)
6.) N-Methyl-3-carboxamid-4-pyridon (1 - 2 %)

Die Zahlen in Klammern geben den prozentualen Anteil der jeweiligen Verbindung an der im Urin insgesamt ausgeschiedenen ^{14}C-Radioaktivität nach Gabe von ^{14}C-3-Acetylpyridin wieder.

Aufgrund der vorgelegten Analysenergebnisse kann gefolgert werden, daß die Metaboliten des 3-Acetylpyridins keine entscheidende Rolle beim Zustandekommen der 3-Acetylpyridinvergiftung spielen.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Beher W. T., W. M. Holliday, O. H. Gaebler
Studies of antimetabolites II. 3-acetylpyridine
J. biol. Chem., 198, 573, (1952)

Beher W. T., W. L. Anthony
Studies of antimetabolites III. The Metabolism of 3-Acetylpyridine in vivo
J. biol. Chem., 203, 895, (1953)

Beher W. T., G. D. Baker, M. Madoff
Studies of antimetabolites V. Metabolism in vivo of 3-acetylpyridine
J. biol. Chem., 234, 2388, (1959)

Bergmeyer H. U.
Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie GMBH, Weinheim / Bergstr. (1962)

Brunnemann A., H. Coper
Untersuchungen zur Wirkungsweise des Pyridin-3-methylcarbinol
Arch. exp. Path. Pharmak., 247, 315, (1964)

Coper H., H. Herken
Schädigung des Zentralnervensystems durch Antimetaboliten des Nicotinsäureamids
Dtsh. Med. W., 42, 2025, (1963)

Dishe Z.
A new spezific color Reaction of Hexuronic Acids
J. biol. Chem., 167, 189, (1947)

Dishe Z.
A Modification of the Carbazole Reaction of Hexuronic Acids for the Study of Polyuronides
J. biol. Chem., 183, 489, (1950)

Fishman W. H., S. Green
Microanalysis of Glucuronide Glucuronic Acid as applied to ß-Glucuronidase and Glucuronic Acid Studies
J. biol. Chem., 215, 527, (1955)

Gaebler O. H., Beher W. T.
Studies of antimetabolites I. Pyridin-3-sulfanic acid and 3-acetylpyridine
J. biol. Chem., 188, 343, (1951)

Gattermann L.
Praxis des Organischen Chemikers
Verlag W. De Gruyter & Co.
Berlin 1961

Harris T.
Untersuchungen über den Stoffwechsel von 3-Acetylpyridin
Inaugural-Dissertation
Berlin 1965

Herken H.
Pharmakologische Untersuchungen zum Problem der selektiven Vulnerabilität des Gehirns
Arzneimittelf., 15, 707, (1965)

Houben - Weyl
Methoden der Organischen Chemie
Herausgegeben von E. Müller
G.-Thieme-Verlag, Stuttgart 1953

Kanig K., W. Koransky, G. Münch, P. E. Schulze
Isolierung eines Metaboliten des 3-Acetylpyridins aus dem Gehirn und seine Identifizierung als Pyridin-3-Methylcarbinol
Arch. exp. Path. Pharmak., 249, 43, (1964)

Kaplan N. O., A. Goldin, S. R. Humphreys et al.
Significance of enzymatically catalyzed exchange reactions in chemotherapy
Science, 120, 437, (1954)

Kaplan N. O., M. M. Ciotti
Chemistry and properties of 3-acetylpyridine analogue of diphosphopyridine nucleotide
J. biol. Chem., 221, 823, (1956)

Leifer E., L. J. Roth, D. S. Hogness, M. H. Corson
The metabolism of radioactive nicotinic acid and nicotinamid
J. biol. Chem., 190, 595, (1951)

McKennis jr. H., L.B. Turnbull, E. R. Bowman
Additional routes in the metabolism of 3-acetylpyridine
J. biol. Chem., 239, 1215, (1964)

Neuhoff V.
Pharmakologische Untersuchungen zur lokalisierten Vulnerabilität des Gehirns
Habilitations-Schrift, Berlin 1964

Neuhoff V., Harris T.
Isolierung und Identifizierung von Metaboliten des 3-Acetylpyridin
Arch. exp. Path. Pharmak., 249, 11, (1964)

Neuhoff V., T. Harris
Isolierung von 3-Acetyl-6-pyridon, einem Metaboliten des 3-Acetylpyridins
Naturwissenschaften, 51, 290, (1964)

Noller C. R.
Lehrbuch der Organischen Chemie
Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1960

Stahl E.
Dünnschicht-Chromatographie
Ein Laboratoriumshandbuch, Springer-Verlag 1962

Wu Chang M. L, C. Johnson
N-Methyl-4-pyridon-5-carboxamid, a New Major Normal Metabolite of Nicotinic Acid in Rat Urine
J. biol. Chem., 234, 1817, (1959)

Herrn Professor Dr. H. H E R K E N, Direktor des Pharmakologischen Institutes, möchte ich für die Förderung der Arbeit und den Arbeitsplatz in seinem Institut danken.

Ferner habe ich zu danken Herrn Dr. G. C L E V E und Herrn Dr. G. S C H U L Z (Physikal.-chem. Abtlg. der Fa. Schering AG., Berlin) für Aufnahme der Infrarot-, Kernresonanz- und Massenspektren, der Titrationskurven und für anregende Diskussionen.

Besonderen Dank schulde ich auch Herrn Privat-Dozenten Dr. V. N E U H O F F für viele Ratschläge und Hinweise bei dieser Arbeit.

LEBENSLAUF

Geboren wurde ich, Friedrich Helmut Köhler, am 30. Sept. 1939 in Frankfurt / Oder als 3. von 4 Söhnen des damaligen Oberpostrates Friedrich Oskar Ludwig Köhler und seiner Ehefrau Annemarie, geb. Pohlmann.

Nach kurzem Aufenthalt in Berlin (1942 / 43) und vorübergehender Evakuierung nach Chorin (Kreis Eberswalde) zogen wir 1944 nach Rhoden, Kreis Waldeck - Hessen. Dort wurde ich Ostern 1946 eingeschult, machte Ostern 1950 die Aufnahmeprüfung für das Staatl. Realgymnasium in Arolsen (Kreis Waldeck) und besuchte die Schule 2 1/2 Monate. Wegen dienstlicher Versetzung meines Vaters nach Köln kamen wir im Sommer 1950 dorthin. Ich besuchte von da ab das Städt. Humboldt-Gymnasium (mathematisch-naturwissenschaftl.) in Köln und legte an der gleichen Schule Ostern 1959 das Abitur ab. Anschließend leistete ich meine 1 1/2 - jährige Wehrpflicht und nahm zum Wintersemester 1960/61 das Medizinstudium an der Universität in Bonn auf. Nach der naturwissenschaftl. Vorprüfung im Sommersemester 1961 und der ärztlichen Vorprüfung im Wintersemester 1962/63 und einem weiteren Semester in Kiel (SS 1963) kam ich zum Wintersemester 1963/64 zur Fortsetzung meines Studiums an die Freie Universität Berlin. Im November 1964 begann ich mit der vorliegenden Arbeit. Sie wurde ein gutes Jahr später beendet. Im März 1967 bestand ich das medizinische Staatsexamen in Berlin.